

背角无齿蚌抗菌肽 *theromacin* 基因 cDNA 全序列克隆及表达分析

张果苹¹, 汪桂玲^{1*}, 郭诗照¹, 白志毅¹, 李家乐^{1,2}

(1. 上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学上海高校水产养殖学 E 研究院, 上海 201306)

摘要: 采用 RACE 方法, 克隆了背角无齿蚌抗菌肽 *theromacin* 基因的 cDNA 全序列。结果显示, 该 cDNA 序列全长为 870 bp, 5' 端非翻译区 104 bp, 3' 端非翻译区 460 bp, 开放阅读框长为 306 bp, 共编码 101 个氨基酸, 相对分子量为 11 166.9 u。同源性分析显示, 该基因编码的蛋白与三角帆蚌 *theromacin* 基因氨基酸序列的相似度最高, 为 73%; 与贻贝中发现的抗菌肽 defensins、mytilins、myticins 和 mytimycins 等 4 种类型相似度较低, 属于 Macin 家族 (登录号: KJ598604)。实时荧光定量 PCR 分析结果显示, 该基因在血液、肝脏、外套膜、鳃、斧足和肠等组织中均有表达, 在外套膜中的表达量最高, 在其他组织中的表达量较低; 经嗜水气单胞菌诱导后, 各个组织的表达量出现明显上调的趋势且与对照组显著差异, 推测 *theromacin* 基因可能在背角无齿蚌的免疫反应中起重要作用。

关键词: 背角无齿蚌; *theromacin* 基因; 分子特征; cDNA 末端快速扩增 (RACE); 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

贝类缺少特异性免疫系统, 抵抗外界病菌的侵袭主要依靠细胞和体液免疫^[1]。体液免疫主要依靠于抗菌肽、溶菌酶、凝集素等相关免疫因子来完成。抗菌肽作为其中的一个重要免疫因子, 广泛存在于贝类中, 并具有热稳定、水溶性好、广谱杀菌等优点^[2]。自 1980 年发现世界上第一种抗菌肽 cecropins^[3-4], 到目前为止, 人们已发现并分离获得 1 200 多种具有抗菌活性的多肽^[5]。相对于脊椎动物, 关于贝类抗菌肽的研究还比较少。目前, 贝类抗菌肽研究较为透彻的是贻贝抗菌肽^[6-7]。贻贝抗菌肽是一种富含半胱氨酸的阳离子多肽, 按其一级结构和二硫键形成的不同可以分为 4 类: 防御素 (defensins)^[8-9]、贻贝素 (mytilins)^[10]、贻贝肽 (myticins)^[11-13] 和贻贝霉素 (mytimycins)^[14-15], 这些抗菌肽各有不同的作用范围, 互为补充, 构成了贻贝的天然免疫系

统^[16]。目前, 又发现另一类抗菌肽基因家族 Macin, 与其他富含半胱氨酸的抗菌肽不同, 其多存于上皮细胞^[17]及周边的脂肪细胞中^[18]。目前, 已经发现的 Macin 家族成员有 4 种, 分别为 *theromacin*^[17]、*hyramacin*^[19]、*mytimacin*^[18] 和 *neuromacin*^[20]。Macin 家族的 *theromacin* 基因已先后在肠蛭 (*Theromyzon tessulatum*)^[17]、水蛭 (*Hirudo medicinalis*)^[21]、三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*)^[22] 和青蛤 (*Cyclina sinensis*)^[23] 中报道。

背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana*) 属瓣鳃纲 (Lamellibranchia), 蚌目 (Unionoida), 蚌科 (Unionidae), 无齿蚌属 (*Anodonta*), 是我国淡水水体中分布广泛的双壳类软体动物之一, 其营养丰富, 肉质鲜美, 壳可入药。目前, 国内外关于背角无齿蚌免疫相关基因的研究报道较少, 本实验根据已获得的三角帆蚌 *theromacin* 基因 cDNA 序

收稿日期: 2013-12-19

修回日期: 2014-03-14

资助项目: 国家自然科学基金 (31101939); 上海市教委科研创新重点项目 (13ZZ128); 上海高校知识服务平台项目 (ZF1206)

通信作者: 汪桂玲, E-mail: glwang@shou.edu.cn

列^[3],利用 RACE 法,以背角无齿蚌为研究材料,克隆了背角无齿蚌 *theromacin* 基因的 cDNA 全序列。对 *theromacin* 基因结构特征和氨基酸序列进行分析,并研究该基因在背角无齿蚌不同组织中的表达及嗜水气单胞菌攻毒后的表达变化,以期进一步探究抗菌肽 Macin 家族在背角无齿蚌免疫系统中的作用,为更好地了解淡水贝类免疫系统和病害防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用 3 龄背角无齿蚌采自浙江省金华市威望养殖新技术有限公司生产基地,于玻璃缸(50 cm × 30 cm × 35 cm)中暂养,小球藻投喂一周。采用随机分组的方式,分为实验组和对照组。实验组闭壳肌中注射 1 mL 浓度为 3×10^7 CFU/mL 的嗜水气单胞菌(灭活),对照组注射 1 mL PBS。在感染后 2、4、6、12、24、48、72 h 时分别取实验蚌与对照蚌的血液、肝脏、外套膜、鳃、斧足和

肠等组织,迅速放入液氮冷冻,存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2 实验方法

背角无齿蚌外套膜总 RNA 提取 活体解剖,取背角无齿蚌外套膜组织 100 mg 左右置于 1.5 mL 无酶离心管中,加入 1 mL RNAisoTM Plus 试剂(宝生物工程(大连)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% DEPC(二乙基焦碳酸酯,diethylprocarbonate)处理过的水溶解总 RNA^[24]。用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 的完整性,并用分光光度计测其 OD 值,进行纯度分析。

***theromacin* 基因全长 cDNA 的扩增、克隆和序列测定** 根据已获得的三角帆蚌 *theromacin* 基因 cDNA 序列^[3],用 Primer Premier 5.0 软件并结合 BLAST 程序设计特异性引物用于中间片段、3' 和 5' 末端扩增和荧光定量,所用引物(表 1)均由上海生工生物技术有限公司合成。

表 1 实验中所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence	用途 usage
<i>theromacin</i> -F	ATACTCTGGCAATCCTCT	中间片段扩增
<i>theromacin</i> -R	ACTGACACTGCCAAGC	fragment amplification
3'-RACE primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT	3'-RACE 通用引物
3'-RACE GSP	AGTGTCCCTTCACAAACGAG	3'-RACE 引物
5'-RACE UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	5'-RACE 通用引物
5'-RACE GSP	GTGTCCCTTCACAAACGAGGCTTGGCAG	5'-RACE 引物
<i>theromacin</i> RT-F	TGTCCATTCTTTTCGGCATCA	荧光定量引物
<i>theromacin</i> RT-R	GCACTGCCAAGCCTCGTT	primers for q PCR
β -actin-F	AAGAGCCGTGTTTCCATCCA	内参基因
β -actin-R	TCCCAGTTGTGTACAATTCCGT	housekeeping gene primers

3' 末端扩增使用 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 试剂盒(TaKaRa 公司)。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,30 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,获得特异性 PCR 产物。5' 末端扩增使用 BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 与 Advantage[®] 2 PCR Enzyme System 试剂盒(BD Biosciences Clontech 公司)。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,5 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,70 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,5 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$,3

min,30 个循环。

RACE 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测,用 TIANgel Midi Purification Kit(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 PGM-T 载体(天根生化科技有限公司)连接构建重组质粒,转化到感受态细胞 *E. coli* DH5 α ,经 LB 平板(含 Amp⁺、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美吉生物技术有限公司进行序列测定。

生物信息学分析 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; 运用 ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 确定开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF); 用 ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 程序预测氨基酸序列的物理参数; 用 Sigal P 3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP>) 预测信号肽; 用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析氨基酸跨膜结构; 用 ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>) 分析氨基酸序列的疏水区; 以及用 MEGA 5.0 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/advanced.html>) 进行预测^[25-26]。

基因组织表达检测 利用 RNAiso™ Plus 试剂 (TaKaRa, 大连) 提取血液、外套膜、肝脏、鳃、斧足和肠的总 RNA, 经 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa, 大连) 反转录成 cDNA, -20 °C 保存。采用 β -actin 作为内参基因 (表 1)。实时荧光定量 PCR 采用 SYBR premix Ex Taq™ 试剂盒 (TaKaRa, 大连) 在 Bio-Rad CFX-96 (Bio-Rad, 美国) 实时荧光定量 PCR 仪上进行。PCR 反应采用 25 μ L 反应体系, 包括 Premix Ex Taq™ (2 \times) 12.5 μ L、上、下游引物 (10 mol/L) 各 0.5 μ L、ddH₂O 9.5 μ L 及模板 cDNA 2.0 μ L。其中每个样品的目的基因和相应的内参基因分别进行 4 次重复。反应程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 30 个循环; 65 ~ 95 °C 获得熔解曲线。对经准确定量的 cDNA 模板进行 6 个梯度的稀释, 每个梯度以 10 为单位, 用于制作目的基因与内参基因的标准曲线。相对表达量数据通过公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。采用 SigmaPlot 12.0 软件绘制矩形图, 使用 SPSS 软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 *theromacin* 基因 cDNA 扩增与序列特征分析

将提取的背角无齿蚌外套膜总 RNA 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像仪观察, 得 3 条清晰的条带, 符合背角无齿蚌总 RNA 的特

点^[27-28]。用 Nanodrop 2000C 分光光度计测 OD 值, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.97, 表明提取的总 RNA 可以用于 RACE 扩增。

RACE 扩增得到的目的片段经克隆测序后, 用 BLAST 比对确定为 *theromacin* 基因 cDNA 序列, 再将这两段序列与中间片段扩增序列拼接, 即得到背角无齿蚌 *theromacin* 基因的完整 cDNA 序列 (图 1), 全长为 870 bp, 其中 5' 端非翻译区 (UTR) 长为 104 bp, 3' 端非翻译区 (UTR) 长 460 bp。开放阅读框长为 306 bp, 编码 101 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。

2.2 *theromacin* 基因的氨基酸序列分析

根据背角无齿蚌 *theromacin* cDNA 全长推测得到 101 个氨基酸, 分子式: C₄₈₄H₇₅₄N₁₃₆O₁₄₂S₁₃, 分子量为 11 166.9 u, 理论等电点为 8.77。不稳定系数为 54.27, 表明此蛋白质的性质不稳定。苏氨酸 (Thr)、半胱氨酸 (Cys) 和丝氨酸 (Ser) 的含量较高, 分别为 12.9%、9.9% 和 8.9%; 酪氨酸 (Tyr) 和缬氨酸 (Val) 含量最低, 均为 1.0%。

本实验中所得背角无齿蚌的 *theromacin* 基因的氨基酸序列 (Aw) 与三角帆蚌 *theromacin* 基因的氨基酸序列 (Hc)、海兔 *theromacin* 基因的氨基酸序列 (Ac)、水蛭 *theromacin* 基因的氨基酸序列 (Hm) 和肠蛭的 *theromacin* 基因的氨基酸序列 (Tt) 进行比对 (图 2), 结果发现 Macin 家族基因序列具有一段由 WSRC 组成的保守性序列, 且富含半胱氨酸。

2.3 背角无齿蚌 *theromacin* 基因的氨基酸序列同源性及分子进化分析

背角无齿蚌 *theromacin* 基因的氨基酸序列同源性结果显示, 与三角帆蚌 Hc 的相似度最高为 73%; 与海兔 Ac、水蛭 Hm 和肠蛭 Tt 的相似度分别为 56%、38% 和 35%。

用 ClustalW 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 5.0 软件将比对结果以邻接法 (NJ 法) 构建系统树 (图 3), 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: 两种贻贝的贻贝肽 (Myticins) 和贻贝素 (Mytilins) 聚在一起; 水蛭、鲍抗菌肽聚在一起; 脊椎动物 (人类与小鼠) 抗菌

肽聚在一起。本实验克隆所得背角无齿蚌 *theromacin* 基因与已发表的几种无脊椎动物如三角帆蚌、肠蛭等抗菌肽 Macin 家族基因相聚,而不

与两种贻贝的抗菌肽聚在一起,由此可以推测此基因属于 Macin 家族基因。

```

ggtgtccatcaatcggcaacaaggaagcgtaaactttgttatcgagggttcgtcaca    60
ttaggttcaaataatttcttcggaacttcagagaacaattgtaaa                104
ATGCCTTAATCAAGACAATGCCATTCTTTTCGGCATCACAATCCTTGCATACTGACT 164
M A L I K T M S I L F G I T I L A I L T 20
ATGACCCCACTCAACTGAGGAAATCCAATCACGGACTGCTGGAATACGTGGAGCCGTTG 224
M T P S T E G N P I T D C W N T W S R C 40
ACAGGATGGAGTCCGGGGCCACAGGAATACTCTGCAATCCTGTGAAGACAGATGTAAA 284
T G W S S G A T G I L W Q S C E D R C K 60
TGCCAAGGTTATGCCACCGGTACCTGTAGGAAAGTTCCTTCGAAGTGCCTTCACAAAC 344
C Q G Y A T G T C R K V P S K C P F T N 80
GAGGCTTGGCAGTGCCAATGTTCTGGAACACGTTCTGGACGAAGACCAATTTGGTCCGGT 404
E A W Q C Q C S G T R S G R R P I W C G 100
TTCTAA 410
F * 101
cgggcttaaaatggaatgtgcacattttgcttctatgttcgagaaggacagaatgtat 470
ctttgaatatgaacaacgacactacatatgaagtgaataatgtcaaatgttataaaatg 530
ttggtctgagagagattaacattatgatccaataacctgaaagagactcagtaatacata 590
ttgtatttatacagatgttttctgcagcaaaaatgaaggaatcgcacaactttggtat 650
tttctgataacggttaaatgaaagaaatgaagtaaacattttatttctgacgtat 710
tcatgtttcaagttatcatttagcaacttttatattaataaataaaatatacaacagct 770
tggctttacatttaagaaccttcatgtttgtacacaaaataaataatgagtatatatca 830
cagcacaataaaataaaataaaataaaataaaataaaataaaataaaataaaataaa 870

```

图 1 背角无齿蚌 *theromacin* 基因的 cDNA 序列及预测的氨基酸序列

小写字母分别代表 5',3'非编码区序列,大写字母代表编码区序列,上面为核苷酸序列,对应下面为编码的氨基酸序列;斜体 ATG 表示起始密码子,* 表示终止密码子,框内斜体的氨基酸表示的信号肽序列,框线内“aataaa”为多聚腺苷酸加尾信号

Fig. 1 *theromacin* gene cDNA sequence in mussel and predicted amino acid sequence

Sequences of 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;Italics ATG is used to indicate the initiation codon;Stop codon is marked with asterisk (*);Italics amino acids in box represents the signal peptide;Putative polyadenylation signals(AATAAA)are boxed

```

Aw      MALIKTMSILFGITILAILTMTPTSEGNPITDCWNTWSRGTGWSSGATGILWQSCEDRCK 60
Hc      MALFKTVTVLSGFMILVAIIMIPSIEGNPITDCWETWSRCSRWSSPATGILWQSCEDRCK 60
Ac      -ACMDKKAANGG-----KEKGPLEACWDEWSRGTGWSSAGTGVLWKSDDQCK 47
Hm      -----CFEIDWSRCSPTASATGVLWRSCDSYCK 28
Tt      MELKSGLSILLCFG-----ICIAVINAGCFEIDWSRCSPTSRGTGVLWRDCDSYCK 51
          *:: **:: :. **::**::*:. **

Aw      -CQGYATGTCRKVPSK-CPFT--NEAWQCQCSGTRSGR--RPIWCGF 101
Hc      -CLGYATGTCREVPSPR-CPLT--DKAWQCQCSGTLSGP--KPENC-- 99
Ac      -KLGKSGGECVLTLPST-CPFTRTDKAYQCCKK----- 78
Hm      VCFKADRGEYDPSPLNCPHR-LPNNKQCRCINARTAKDNRNPTCWA 74
Tt      VCFKADRGEYDPSPLNCPQR-LPNNKQCRCINARTAKDNRNPTCWA 97
          * * * * : * * *

```

图 2 背角无齿蚌 *theromacin* 氨基酸序列对比

- 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,C 表示相同位置的半胱氨酸残基,框线内表示 Macin 家族保守序列

Fig. 2 *theromacin* amino acid sequence in *A. woodiana* compared with amino acid sequences of other species

- indicate the amino acid gaps which are necessary to align these sequences;* is used to indicate highly conserved amino acid residue;: indicate conservative amino acid residue which was replaced;. represents simily amino acid;C indicate a cysteine;. residue which was at the same position. The conserved sequence of Macin family is boxed

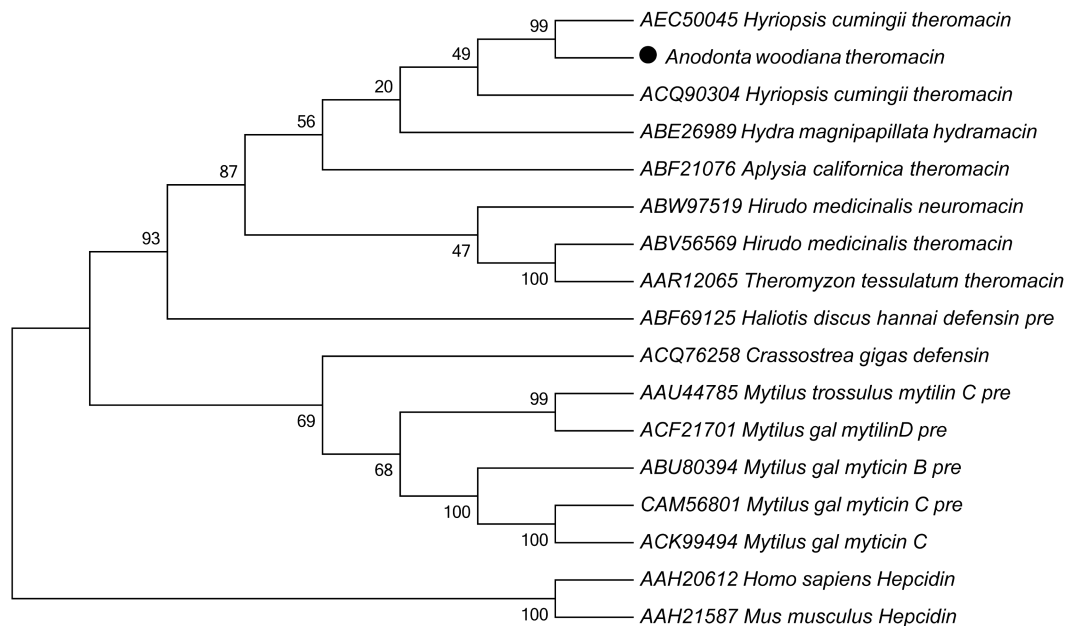


图3 不同类型抗菌肽氨基酸序列构建的NJ系统进化树

编号代表 GenBank 序列号; Clustal W 软件进行序列的对位排列, Mega 5.0 软件中的 NJ 法建树, 节点上的数字为重复 1 000 次的自展 (Bootstrap) 检验置信值

Fig. 3 NJ phylogenetic tree of different types of amino acid sequences of antimicrobial peptides

The sequence number comes from GenBank; sequence was aligned by software Clustal W, NJ law contribution was made by Mega 5.0, the numbers on the node is repeated 1 000 times since the exhibition (bootstrap) test confidence value

2.4 背角无齿蚌 *theromacin* 不同组织的表达分析

利用实时荧光定量 PCR 分析了 *theromacin* 基因在血液、肝脏、外套膜、鳃、斧足和肠 6 个组织的表达情况, 该基因在以上 6 个组织中普遍表达 (图 4), 但表达量存在明显差异, 其中外套膜中表达含量最高, 血液、肝脏、鳃中含量较低, 推测可能 *theromacin* 基因主要在外套膜中起免疫作用。

2.5 背角无齿蚌攻毒后 *theromacin* 不同组织中的时序性表达分析

注射嗜水气单胞菌后, 血液中 *theromacin* 表达量由 2 h 后开始升高, 48 h 时达到最高, 72 h 时开始逐渐下降, 除 2 h 外均与对照组有明显差异; 肝脏中, 由 2 h 后开始升高, 中间有所下降, 48 h 时达到最高, 72 h 时趋于稳定, 与对照组有明显差异; 外套膜中, 由 2 h 后开始升高, 中间有所下降, 48 h 时达到最高, 72 h 时开始逐渐下降趋于稳定, 除 2 h 低于对照组外, 其余均与对照组有明显差异; 鳃中由 2 h 后开始升高, 中间有所下降, 48 h 时达到最高, 72 h 时开始逐渐下降趋于稳定, 除 2 h 外均与对照组有明显差异; 斧足中由 2 h 后开始升高, 4 h 时达到最高, 然后开始下降, 72 h 时趋于稳定, 除 72 h 外均与对照组有明显差异;

肠中由 2 h 后开始升高, 中间有波动, 在 72 h 时达到最高, 与对照组有明显差异 (图 5)。

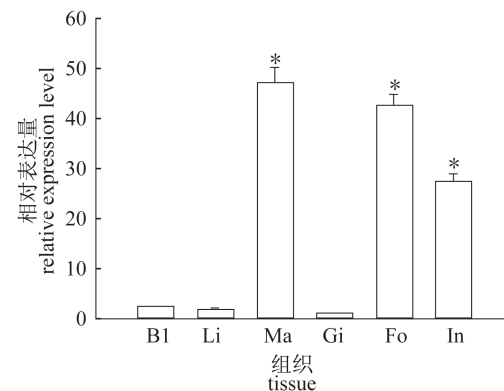


图4 背角无齿蚌 *theromacin* 基因不同组织表达情况

B1. 血液; Li. 肝脏; Ma. 外套膜; Gi. 鳃; Fo. 斧足; In. 肠。以 β -actin 为内参基因, 并进行归一化处理。所显示的为相对定量数据为平均值 \pm 标准误, “*”表示 $P < 0.05$

Fig. 4 Expression of *theromacin* in different tissues in *A. woodiana*

B1. blood; Li. liver; Ma. mantle; Gi. gill; Fo. foot; In. intestines. The relative expression of the gene transcript from qRT-PCR analysis was calculated to the β -actin mRNA level. Data are given as plus or minus the standard error of the means (means \pm SE), * $P < 0.05$

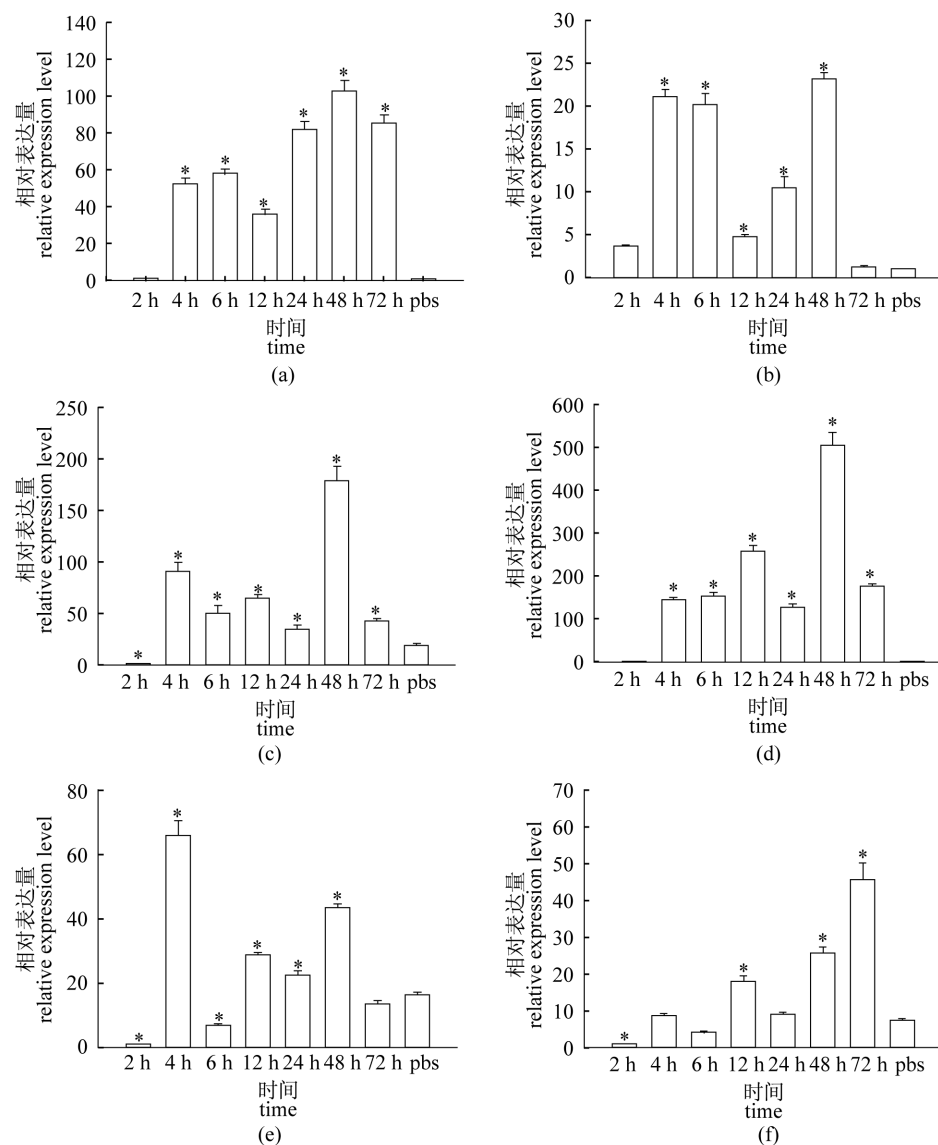


图5 背角无齿蚌 *theromacin* 基因诱导后不同组织的相对表达量

(a) 血液; (b) 肝脏; (c) 外套膜; (d) 鳃; (e) 斧足; (f) 肠。* 表示相对表达量显著高于对照样本 ($P < 0.05$)

Fig. 5 Relative expression of *theromacin* in various tissues after induction

(a) blood; (b) liver; (c) mantle; (d) gill; (e) foot; (f) intestine. Asterisks indicate that the relative expressions are significantly higher than those of the corresponding control samples ($P < 0.05$)

3 讨论

本研究采用 RACE 法,从背角无齿蚌中克隆了抗菌肽 *theromacin* 基因的 cDNA 全序列。有研究发现,水蛭 Macin 家族的两个成员 *theromacin* 和 *neuromacin* 均含有 8 个保守的半胱氨酸残基^[21],在紫贻贝和青蛤的 *mytimacin* 研究中亦发现具有相同的 8 个保守的半胱氨酸残基^[18]。由此可推测,Macin 家族基因可能均具有相同的 8 个保守的半胱氨酸残基,可以形成 4 个二硫键,构

成 Cys1-Cys6、Cys2-Cys5、Cys3-Cys7、Cys4-Cys8 的典型结构,此结构可能与该家族基因的功能相关。本实验获得的背角无齿蚌 *theromacin* 基因的氨基酸序列同样含有 8 个保守的半胱氨酸残基,此外,还有另外两个保守半胱氨酸残基的存在,这与三角帆蚌、肠蛭和水蛭的 *theromacin* 基因一致,说明可能是 *theromacin* 基因所独有的。

通过对 Macin 家族基因的蛋白质同源性进一步比较发现,Macin 家族基因的保守性极强,其位于第 1 位和第 2 位半胱氨酸之间存在一段相同的

WSRC 序列,推测该序列可能与该家族基因的生物功能密切相关^[23],本实验中的 *theromacin* 基因也存在此段序列。同时,有研究认为富含半胱氨酸的抗菌肽可能在起源上较为古老^[29]。因此,或许 Macin 家族编码的抗菌肽可以被认为是一种半胱氨酸富集的古老抗菌肽。

本研究结果显示,*theromacin* 基因在背角无齿蚌各个组织中均有表达,且组织间的差异性极其显著,在外套膜中的表达量最高,与青蛤^[23]及紫贻贝 *mytimacin-3*^[18]的研究结果一致。这可能与贝类的生活习性相关,因为贝类在滤食和呼吸时,外套膜的表皮细胞与水频繁接触^[30-31]。Bai 等^[32]认为三角帆蚌的外套膜含有多种抗菌肽基因,其中就包括 Macin 家族基因的成员^[32];此外,研究发现,此家族基因基本都在高度分化的细胞中表达,尤其是上皮细胞^[17,33]。由此可以推测,外套膜的表皮细胞可能是贝类非特异性免疫的一道重要防线,所以 Macin 家族基因在外套膜中的表达量最高。

本研究结果发现,在嗜水气单胞菌诱导后,实验组的 *theromacin* 基因在各个组织中的相对表达量均有明显的变化,与对照组有显著性差异。诱导 4 h 后,6 个组织都出现了上调的趋势,血液、肝脏、外套膜、鳃均在 48 h 时达到最大值然后下降;斧足在 4 h 时即达到了最大值;肠在 72 h 后才达到最大值。由此可见,嗜水气单胞菌对 *theromacin* 基因有很强的诱导作用。当病原物侵袭背角无齿蚌时,免疫相关基因开始启动,大量合成抗菌物质;当病原物被抑制后,反馈机制开始起作用,抗菌物质的合成开始减少。因此,*theromacin* 基因在细菌诱导时,各个组织均出现了先上升、后下降的趋势,推测 *theromacin* 基因可能在背角无齿蚌的免疫反应中起重要的作用。

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] Mitta G, Vandenbulcke F, Roch P. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity [J]. FEBS Letters, 2000, 486 (3): 185 - 190.
- [3] Boman H G, Hultmark D. Cell free immunity in insects[J]. Annual Review of Microbiology, 1987, 41(7): 103 - 126.
- [4] Steiner H D, Hultmark D, Engstrom H, et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity [J]. Nature, 1981, 299 (4): 246 - 248.
- [5] Dong S J, Wang G L, Bai Z Y, et al. Full-length cDNA cloning and molecular characteristic research of AMP gene in *Hyriopsis cumingii* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(3): 342 - 348. [董姝君,汪桂玲,白志毅,等.三角帆蚌 AMP 基因 cDNA 全序列的克隆及分子特征研究.上海海洋大学学报,2011,20(3):342-348.]
- [6] 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.
- [7] Liao Z, Liu M, Wang R X, et al. cDNA clone and sequence analysis of mutilin and myticin from *Mytiluscoruscus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(7): 1025 - 1033. [廖智,刘梅,王日昕,等.厚壳贻贝抗菌肽 mytilin 和 myticin 的 cDNA 基因的克隆与序列分析.水产学报,2010,34(7):1025-1033.]
- [8] Hubert F. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) [J]. European Journal of Biochemistry, 1996, 240(1): 302 - 306.
- [9] 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]. Journal of Cell Science, 1999, 112(22): 4233 - 4242.
- [10] Mitta G, Hubert F, Noel T, et al. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. European Journal of Biochemistry, 1999, 265(1): 71 - 78.
- [11] 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]. Developmental and Comparative Immunology, 2000, 24(4): 381 - 393.
- [12] Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, et al. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense [J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(17): 12954 - 12962.
- [13] Roch P, Yang Y, Toubiana M, et al. NMR structure of mussel mytilin, and antiviral-antibacterial activities of derived synthetic peptides [J]. Developmental and

- Comparative Immunology, 2008, 32(3): 227 - 238.
- [14] Charlet M, Chernysh S, Philippe H, *et al.* Innate immunity isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(36): 21808 - 21813.
- [15] Sonthi M, Toubiana M, Pallavicini A, *et al.* Diversity of coding sequences and gene structures of the antifungal peptide mytimycin (MytM) from the mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* [J]. Marine Biotechnology, 2011, 13(5): 857 - 867.
- [16] Yu D D, Ning X X, Ren G R, *et al.* Research advance of antimicrobial peptides isolated from mussels [J]. Marine Sciences, 2009, 33(11): 95 - 99. [于道德, 宁璇璇, 任贵如, 等. 贻贝抗菌肽的研究进展. 海洋科学, 2009, 33(11): 95 - 99.]
- [17] Tasiemski A, Vandenbulcke F, Mitta G, *et al.* Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(30): 30973 - 30978.
- [18] Marco G, Gianluca DM, Manfrin C, *et al.* Big defensins and mytimacins, new AMP families of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2012, 36(2): 390 - 399.
- [19] Jung S, Dingley A J, Augustin R, *et al.* Hydramacin-1, structure and antibacterial activity of a protein from the basal metazoan *Hydra* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(3): 1896 - 1905.
- [20] Sascha J, Frank D S, Chien H, *et al.* Macin Family of Antimicrobial Proteins Combines Antimicrobial and Nerve Repair Activities [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(17): 14246 - 14258.
- [21] Schikorski D, Cuvillier-Hot V, Leippe M, *et al.* Microbial challenge promotes the regenerative process of the injured central nervous system of the medicinal leech by inducing the synthesis of antimicrobial peptides in neurons and microglia [J]. Journal of Immunology, 2008, 181(2): 1083 - 1095.
- [22] Xu Q, Wang G, Yuan H, *et al.* cDNA sequence and expression analysis of an antimicrobial peptide, *theromacin*, in the triangle-shell pearl mussel *Hyriopsis cumingii* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 157(1): 119 - 126.
- [23] Liu X X, Luo K Y, Ge D Y, *et al.* Molecular cloning and expression of mytimacin gene from *Cyclina sinensis* [J]. Sichuan Journal of Zoology, 2013, 32(1): 35 - 39. [刘欣欣, 罗凯娅, 葛端阳, 等. 青蛤抗菌肽基因的克隆及其在组织间的表达分析. 四川动物, 2013, 32(1): 35 - 39.]
- [24] Wang G L, Li X L, Li J L. Association between SNPs in interferon regulatory factor 2 (IRF-2) gene and resistance to *Aeromonas hydrophila* in freshwater mussel *Hyriopsis cumingii* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(5): 1366 - 1371.
- [25] Cole C, Barber J D, Barton G J. The Jpred 3 secondary structure prediction server [J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(1): 197 - 201.
- [26] Lambert C, Nadia L, Xavier D B, *et al.* ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures [J]. Bioinformatics, 2002, 18(9): 1250 - 1256.
- [27] Wang G L, Li X L, Li J L. Significant association between SNPs in the extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) gene and resistance to *Aeromonas hydrophila* in the freshwater mussel *Hyriopsis cumingii* [J]. Animal Genetics, 2013, 44(6): 693 - 702.
- [28] 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 & Comparative Immunology, 2008, 24(4): 381 - 393.
- [29] 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.
- [30] Xia X L, Wang G L, Bai Z Y, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of calreticulin cDNA from *Hyriopsis cumingii* [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(5): 40 - 47. [夏秀琳, 汪桂玲, 白志毅, 等. 三角帆蚌钙网蛋白基因 cDNA 的分子特征与表达分析. 水产学报, 2013, 37(5): 40 - 47.]
- [31] Sun G, Sheng X L. Ecological engineering for eutrophication control in lake [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2001, 12(14): 590 - 592.
- [32] Bai Z Y, Yin Y X, Hu S N, *et al.* Identification of genes potentially involved in pearl formation in freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) by expressed sequence tag analysis of mantle [J]. Journal of Shellfish Research, 2010, 29(2): 527 - 534.
- [33] Bosch T G, Augustin R, Anton-Erxleben F, *et al.* Uncovering the evolutionary history of innate

immunity; the simple metazoan Hydra uses epithelial cells for host defence [J]. Developmental and

Comparative Immunology, 2009, 33(4): 559 – 569.

Full-length cDNA cloning and expression analysis of *theromacin* gene in *Anodonta woodiana*

ZHANG Guoping¹, WANG Guiling^{1*}, GUO Shizhao, BAI Zhiyi¹, LI Jiale^{1,2}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai 201306, China;

2. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Anodonta woodiana* belongs to the Unionidae that consists of freshwater bivalve mollusks and it is the main freshwater mussel in China. Theromacin is an antimicrobial peptide that is an important component of the natural defenses of freshwater mussel. In this study, a *theromacin* gene from *A. woodiana* was identified and characterized. The full-length cDNA sequence of *theromacin* gene of *A. woodiana* was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE). A 870 bp cDNA sequence contained a 306 bp open reading frame (ORF) encoding 101 amino acids, a 104 bp 5' untranslated region (5' UTR), and a 460 bp 3' untranslated region (3' UTR). The molecular weight of this mature peptide was estimated to be 11 166.9 u. Homology analysis indicated that amino acid sequence showed the highest similarity with *theromacin* in *Hyriopsis cumingii* (73%), and lower similarity with defensins, mytilins, myticins and mytimycins in mussels. It belongs to the macin family. Real-time quantitative PCR showed that *theromacin* gene expressed in a wide range of tissues including the mantle, blood, gill, foot, liver and intestine, with the highest level of transcripts in mantle, followed by foot, while in other tissues it was lowly expressed. After being challenged with *Aeromonas hydrophila*, the expression of *theromacin* gene was increased significantly in 6 tissues compared with the control mussel. The results suggested that *theromacin* gene might play an important role in the immune reaction of *A. woodiana*.

Key words: *Anodonta woodiana*; *theromacin* gene; molecular characteristics; RACE; real-time quantitative PCR

Corresponding author: WANG Guiling. E-mail: glwang@shou.edu.cn