

## 厚壳贻贝抗菌肽 Mytilin 的初步鉴定

王日昕<sup>1,2</sup>, 刘梅<sup>2</sup>, 廖智<sup>2</sup>, 鲁涛<sup>2</sup>, 武梅<sup>2</sup>, 何光源<sup>1\*</sup>

1. 华中科技大学中英 HUST-RRes 基因工程和基因组学联合实验室, 国家国际科技合作基地, 教育部分子生物物理重点实验室, 基因研究所, 生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074;
2. 浙江海洋学院海洋科学学院, 海洋生物资源及分子工程实验室, 浙江 舟山 316004)

**摘要:**厚壳贻贝是我国具有重大经济价值的水产养殖贝类,对其抗菌肽的研究有助于人们了解厚壳贻贝的免疫机制。为了解厚壳贻贝血清中抗菌肽 Mytilin 的分子组成和特性,采用多维高效液相色谱对厚壳贻贝血清进行分离纯化,从中获得3种对革兰氏阳性菌以及阴性菌均有抑制作用的抗菌肽分子,序列分析表明3种抗菌肽具有较高的序列相似性,均属于贻贝抗菌肽 Mytilin 家族,分别命名为 Mytilin-1, Mytilin-2 和 Mytilin-3。其中, Mytilin-1 为34个氨基酸残基构成的多肽,其分子量为3 885.17 u,含8个半胱氨酸,形成4对二硫键。根据所测 Mytilin-1 的氨基酸序列设计特异性引物,通过菌落 PCR 方法筛选厚壳贻贝 cDNA 文库,获得 Mytilin-1 的 cDNA 基因并进行了序列分析。以上研究结果表明,作为贻贝的主要抗菌肽家族, Mytilin 在厚壳贻贝血清中具有较高丰度,对其蛋白质序列以及基因序列的研究为深入了解厚壳贻贝 Mytilin 抗菌肽的分子多样性奠定了基础。

**关键词:**厚壳贻贝; 抗菌肽; Mytilin; cDNA

**中图分类号:** Q 785; S 917

**文献标识码:** A

抗菌肽是生物进化的产物,其分子量通常在2 000~7 000 u,由20~60个氨基酸残基组成。它广泛分布于动物和植物界,在生物免疫系统的进化中扮演了十分重要的角色<sup>[1-2]</sup>。人们分别从植物<sup>[3]</sup>,无脊椎动物<sup>[4]</sup>和脊椎动物<sup>[5]</sup>的不同组织和细胞类型中分离到为数众多的抗菌肽,而人工设计和改造的抗菌肽更是不计其数,这种广泛性存在也表明了抗菌肽作为先天免疫的效应因子(effectors in innate immunity)在生物体免疫系统有着至关重要的作用<sup>[6-7]</sup>。

在抗菌肽的研究中,贻贝是目前海洋生物抗菌肽研究中发现抗菌肽种类最多的物种之一,因此受到人们的关注。贻贝是一种常见的海洋生物,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,这些抗菌肽构成了贻贝的天然防御屏障。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(包括 Mytilin A, B, C, D 和 G1)<sup>[8]</sup>, MGD(包括 MGD-1 和 MGD-2)<sup>[9-11]</sup>, Myticin(包括 Myticin A 和 B)<sup>[12]</sup>以及 Mytimycin<sup>[8]</sup>。其中 Mytilin 是目前从贻贝中发现种类最多、丰度最高的抗菌肽家族,在地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)和紫贻贝(*Mytilus edulis*)等主要贻贝中均有发现,而厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)的 Mytilin 研究尚未见报道。在 Mytilin 的家族成员中, Mytilin B, Mytilin C, Mytilin D 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有抑制活性<sup>[8]</sup>;而 Mytilin G1 则只对革兰氏阳性菌有抗菌活性<sup>[8]</sup>;此外, Mytilin B 和 Mytilin D 还具有强的抗真菌活性<sup>[13]</sup>。

收稿日期:2009-07-02 修回日期:2009-08-18

资助项目:国家科技支撑计划(2007BAD43B08);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);浙江省科技厅新苗人才计划项目(2008R40G2110003);浙江省舟山市科技局项目(Y20082080)

通讯作者:何光源, E-mail: hegy@hust.edu.cn

厚壳贻贝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报道尚不多见。通过多维色谱方法结合抗菌活性检测和质谱分析,我们从厚壳贻贝血清中分离纯化到3种抗菌肽成分,氨基酸序列分析表明,这3种抗菌肽均属于 Mytilin 家族,分别命名为 Mytilin-1, 2 和 3。同时,根据 Mytilin-1 的氨基酸序列设计引物,从厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库中克隆了 Mytilin-1 的 cDNA 基因并进行了序列分析。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 动物与试剂

**实验动物** 成年厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 采自浙江舟山海域,以洁净海水在通氧条件下饲养于恒温水族箱(18~20℃)。

**试剂** 三氟乙酸(TFA), $\alpha$ -氰基-4-羟基-肉桂酸(CCA)购自 Sigma 公司;所有测序试剂均购自 Applied Biosystems 公司;色谱纯乙腈购自美国 TEDIA 公司;Taq 酶为 Ferments 公司产品;dNTP、5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷(X-gal)、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、氨苄青霉素(Ampicillin)购自上海捷瑞公司;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

**厚壳贻贝的诱导与amp;血清的收集** 厚壳贻贝饲养 24 h 后,参照文献[9]的方法,以灭活的大肠杆菌注射厚壳贻贝进行诱导,诱导 24 h 后,以内含抗凝剂(Alsever 液)的注射器收集厚壳贻贝血淋巴,立即离心(4℃,800×g,15 min),收集上清,以含 0.1% 三氟乙酸(TFA)的去离子水按 1:1 比例稀释,之后调 pH 至 3.75,低温(4℃)搅拌 20 min 后经离心(4℃,10 000×g,20 min),收集上清于 -20℃ 冰箱保存备用。

**厚壳贻贝血清抗菌肽的分离纯化** 采用高效液相色谱对厚壳贻贝血清进行分离纯化,所有分离步骤均在 Waters 600E 型高效液相色谱仪上完成,检测器为 Waters 2487 型紫外检测器,检测波长为 280 nm。

第一步:采用反相高效液相色谱,反相色谱柱为 Sunfire™ Prep C18(10×250 mm, Waters 公司),分别以含 0.1% TFA 的 5% 乙腈,45% 乙腈

和 90% 乙腈洗脱,流速为 3 mL/min,分别收集洗脱液,冷冻干燥后进行抗菌活性检测。

第二步:对上述步骤中获得的具有抗菌活性的组分进行分子筛分离,色谱柱为 Ultrahydrogel™ 500 高压分子筛柱(7.8×300 mm, Waters 公司),洗脱液为去离子水(含 0.1% TFA),流速为 0.5 mL/min,收集各洗脱峰,经冷冻干燥后进行抗菌活性检测。

第三步:对上述步骤中具有抗菌活性的洗脱峰组分进行进一步反相高效液相色谱分离,反相色谱柱为 218TP54 C18(4.6×250 mm, Vydac 公司),洗脱液分别为含 0.1% TFA 的水(A液)和乙腈(B液),采用线性梯度洗脱,50 min 内,B液从 20% 上升到 40%,流速为 1 mL/min,收集各洗脱峰经冷冻干燥后进行抗菌活性检测。

**抗菌活性检测** 参照文献[13]的方法,采用传统的滤纸片法(kirby-bauer method)测定上述步骤中各洗脱组分的抗菌活性,测试菌分别为藤黄叠球菌(*Sarcina lutea*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

**质谱分析** 利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)(Voyager-DE™ STR Biospectrometry™ workstation, Applied Biosystems 公司)测定分子量。采用线性阳离子模式;N<sub>2</sub>光源 337 nm;离子加速电压为 20 000 V;基质为  $\alpha$ -氰基-4-羟基-肉桂酸(CCA)。通过以下方式制备样品:取 1  $\mu$ L 样品液加入到 9  $\mu$ L CCA(含 0.1% TFA)的 50% 乙腈饱和溶液,混匀后取 1  $\mu$ L 点样,室温干燥后测定,并采用内标法校正。

**氨基酸序列分析** 厚壳贻贝抗菌肽 Mytilin 的氨基酸序列测定采用 N-端 Edman 降解法在 PPSQ-31A / 33A 气相测序仪上(日本岛津公司)完成。采用仪器配备的标准程序测序,测 36 个循环,在线反相高效液相色谱检测并结合氨基酸标准图谱判断氨基酸种类,最终准确读出所测样品的氨基酸序列。

通过 <http://www.expasy.org/tools/#primary> 在线分析厚壳贻贝抗菌肽 Mytilin 的理论分子量和等电点,通过 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 进行序列搜索与amp;比对。

厚壳贻贝抗菌肽 Mytilin 的 cDNA 基因克隆根据厚壳贻贝 Mytilin-1 的 N 端序列(<sub>11</sub>RARRCKG<sub>17</sub>)设计上游兼并引物 primer-1[5'-

G(A/G/C/T)GC(A/G/C/T)(A/C)G(A/G/C/T)(A/C)G(A/G/C/T)TG(C/T)AA(A/G)GG-3'];根据厚壳贻贝 Mytilin-1 的 C 端序列(<sub>29</sub>CKCFRC<sub>34</sub>)设计下游兼并引物 primer-2 [5'-(A/G)CA(A/G/C/T)C(G/T)(A/G)AA(A/G)CA(C/T)TT(A/G)CA-3']。参照文献[8]的方法,利用菌落 PCR 方法对厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库(采用 Invitrogen 公司的 cDNA 文库构建试剂盒构建)进行筛选,通过琼脂糖凝胶电泳检测特异性扩增条带,对有扩增条带的克隆进行测序分析,测得的 cDNA 序列采用 Lasergene 软件的 Editseq 模块进行分析。

## 2 结果

### 2.1 厚壳贻贝抗菌肽 Mytilin 的分离纯化

通过反相高效液相色谱的预分离及抗菌活性检测,发现 45% 乙腈洗脱组分具有抗菌活性;该洗脱组分通过高压分子筛柱的进一步分离,经 280 nm 紫外检测,可获得 5 个洗脱峰,分别命名为 GF1 到 GF5(图 1);对上述 5 个洗脱峰的抗菌活性检测表明,GF2 和 GF5 表现出抗菌活性;收集 GF2 和 GF5 洗脱组分,经进一步反相高效液相色谱分离,对收集的各洗脱峰进行抗菌活性筛选,共获得 3 个具有抗菌活性的洗脱峰,分别命名为 M1, M2 和 M3(图 2A)。对上述目的峰分别进行质谱检测,分析其精确分子量以及纯度,并进行氨基酸序列分析。

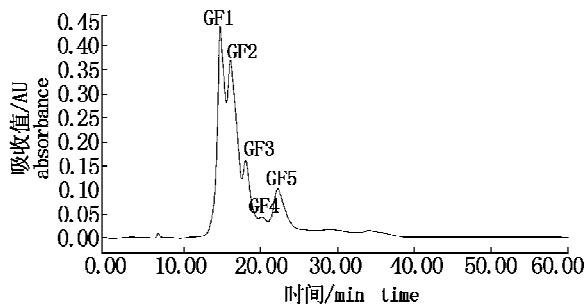


图 1 厚壳贻贝血清分子筛分离图谱

以去离子水为洗脱液,流速 0.5 mL/min,共收集 5 个洗脱峰,分别命名为 GF1-GF5

Fig.1 *Mytilus coruscus* serum separated by Gel filtration

Five fractions (named GF1 to GF5 accordingly) collected respectively with pure water as elution at flow rate 0.5 mL/min

### 2.2 厚壳贻贝抗菌肽 Mytilin 的分子量及氨基酸序列

对图 2A 中的目的峰进行质谱检测,结果(图 2B)表明,3 个目的峰均表现为单一分子量,分别为 3885.17 u(M1),3993.26 u(M2)和 3991.39 u(M3);通过进一步的氨基酸测序分析,我们获得了 M1 的全序列以及 M2 和 M3 的 N 端部分序列,序列结果表明,3 种抗菌肽的 N 端部分具有很高的序列相似性。通过对以上序列进行在线 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)搜索发现,厚壳贻贝的这 3 种抗菌肽与来自地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)以及紫贻贝(*Mytilus edulis*)的抗菌肽 Mytilin 家族成员具有较高的序列相似性(>64%,图 3),因此我们将厚壳贻贝中的这 3 种抗菌肽分别命名为 Mytilin-1 (3885.17 u), Mytilin-2 (3993.26 u) 和 Mytilin-3 (3991.39 u)。其中,厚壳贻贝 Mytilin-1 由 34 个氨基酸组成,含 8 个半胱氨酸,等电点(pI)为 10.26。通过比较厚壳贻贝 Mytilin-1 的实测分子量(3885.17 u)和理论分子量(3893.70 u),其差异为 8 u,推测厚壳贻贝 Mytilin-1 可能形成 4 对二硫键。

### 2.3 厚壳贻贝抗菌肽 Mytilin-1 的 cDNA 序列

根据厚壳贻贝 Mytilin-1 的 N 端和 C 端氨基酸序列设计引物,通过对厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库进行筛选,我们获得了 Mytilin-1 的 cDNA 克隆并进行了序列分析,结果见图 4。厚壳贻贝 Mytilin-1 的 cDNA 基因全长为 487 bp(该序列已提交 Genebank 数据库,编号为 FJ973154),包括 5'端非翻译区,开放阅读框和 3'端非翻译区。其开放阅读框全长为 306 bp,编码一条总长为 102 个氨基酸残基的多肽,包括信号肽序列(22 个氨基酸),成熟肽序列(34 个氨基酸)以及成熟肽后区域(46 个氨基酸)。其信号肽区域富含疏水性氨基酸(包括异亮氨酸,亮氨酸,丙氨酸以及缬氨酸等),而信号肽 C 端则含有两个酸性氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸);信号肽剪切位点位于第 22 号的丙氨酸和 23 号的苏氨酸之间;成熟肽后区域富含酸性氨基酸(9 个天冬氨酸以及谷氨酸);加尾信号(-AATAAA-)位于多聚 A 尾巴上游 14 bp 处。

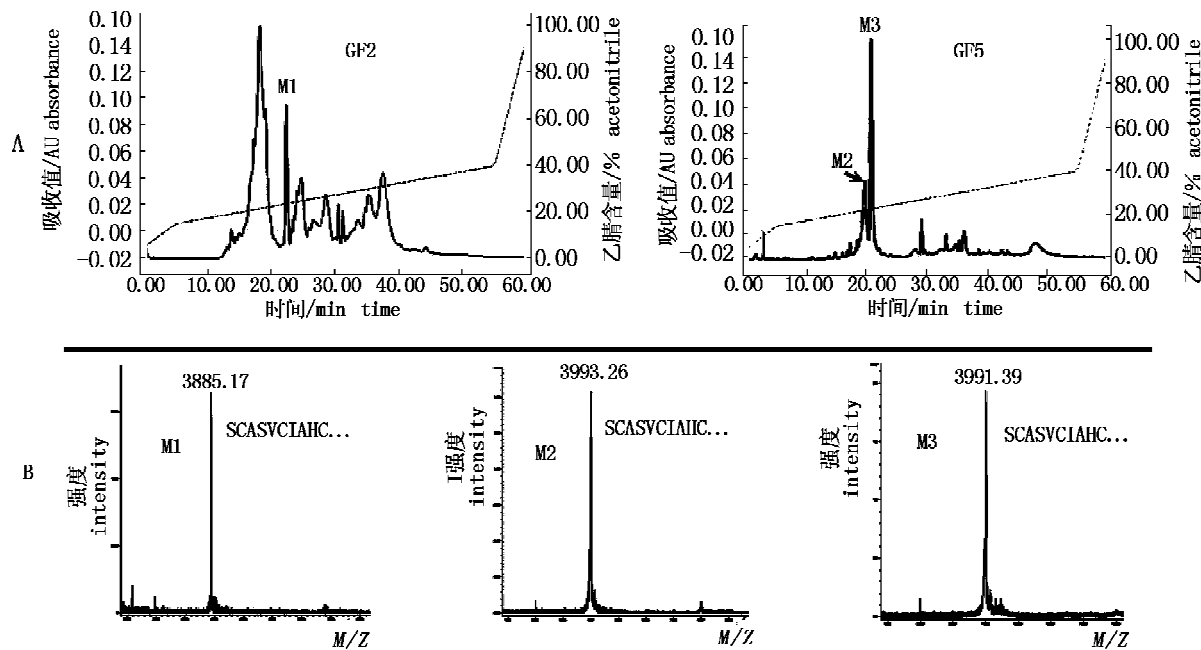


图2 厚壳贻贝血清分子筛分离后 GF2 和 GF5 洗脱峰的 C18 反相 HPLC 分离,质谱检测及氨基酸序列图  
A:经检测具有抗菌活性的洗脱峰分别命名为 M1, M2 和 M3; B:对 M1, M2 和 M3 的质谱检测以及 N 端部分氨基酸序列 (M1 获得全序列)

Fig. 2 The C18 reversed-phase HPLC separation of GF2 and GF5 from gel-filtration of *Mytilus coruscus* serum  
A. The elutions with antibacterial function were named M1, M2 and M3, respectively; B. the mass and the sequences of M1, M2 and M3 were determined by Mass spectrum and Edman sequential analysis, respectively

	10	20	30	identity
<i>Mytilus coruscus</i> Mytilin-1	SCASRCKSRCRARRCKGYAAVDFGRRCICKCFRC			
<i>Mytilus galloprovincialis</i> Mytilin D	GCASRCKAKCAGRRCKGWASASFRRCYCKCFRC			73%
<i>Mytilus edulis</i> Mytilin A	GCASRCKAKCAGRRCKGWASASFRRCYCKCFRC			67%
<i>Mytilus falloprovincialis</i> Mytilin B	SCASRCKGHCRARRCGYYVSVLYRGRYCKCLRC			64%
<i>Mytilus edulis</i> Mytilin B	SCASRCKGHCRARRCGYYVSVLYRGRYCKCLRC			64%

图3 厚壳贻贝抗菌肽 Mytilin-1 经在线 BLAST 搜索后的序列对比图  
灰色部分代表保守性的氨基酸残基

Fig. 3 The sequential comparison of Mytilin-1 from *Mytilus coruscus* with Mytilins from other *Mytilus*  
Identical residues are represented by gray

### 3 讨论

Mytilin 在贻贝的防御系统中发挥着至关重要的作用,其抗菌活性强,且对革兰氏阴性菌,革兰氏阳性菌,真菌以及病毒等均具有抑制作用<sup>[14-15]</sup>。此外, Mitta 等<sup>[16]</sup>的研究表明,69%的贻贝血细胞中含有 Mytilin 分子,其中 37%的贻贝血细胞只含有 Mytilin 而未检测到其他类型的抗菌肽分子,以上研究表明 Mytilin 是贻贝血清中最主要的抗菌肽家族。Mytilin 家族也是目前在贻贝抗菌肽研究中,发现成员最多的一类抗菌肽,

在不同种贻贝中共分离到 5 种 Mytilin (分别为 Mytilin A, B, C, D 和 G1)<sup>[17]</sup>,其中, Mytilin-B 还存在 mRNA 分子多态性现象<sup>[18]</sup>,这表明 Mytilin 存在高度的分子多样性。这些 Mytilin 分子具有一些共同的结构特点,例如,富含碱性氨基酸,含 8 个半胱氨酸并形成 4 对二硫键,其半胱氨酸分布模体为 C-x(3)-C-x(3)-C-x(4)-C-x(11)-C-x-C-x-C-x(2)-C,其二硫键连接方式为 CI-CV, CII-CVI, CIII-CVII, CIV-CVIII<sup>[19]</sup>。

贻贝抗菌肽在贻贝血清中丰度极低,其中丰度最高的 Mytilin 在贻贝血清中的浓度也仅为

```

cccac gcgtc cgcaa agtgc ctttg gatcc aat 1 ATG AAG GTA GCA ATT ATT CTG GCT
      M K V A I I L A
10 ATT GCT CTT GCA GTA CTT CTT ATA GTT CAT GAA TCA GAT GCA AGT TGT GCT
      I A L A V L L I V H E S D A S C A
      30 TCC AGA TGT AAA AGT CGT TGT AGA GCC AGA CGC TGT AAA GGT TAT GCG
      S R C K S R C R A R R C K G Y A
      40 GCA GTC AGT TTT GGA AGA CGA TGT ATC TGC AAA TGT TTC CGT TGT GCC
      A V S F G R R C I C K C F R C A
      50 AGT GAG CAT ACC ATG AAA TTC CCT GAA AAT GAA GGA TCA ACT CAG ATG
      S E H T M K F P E N E G S T Q M
      60 TTT CGA CAG ATA AAT GAC AAT GAG GAC ACT GAA CTC CCC CAG GAT ATT
      F P Q I N D N E D T E L P Q D I
      70 CCG AAA GGA CAC ACC GAT CAA GGT GAA ACT GGC ATG TAA aagga aggtc
      P K G H T D Q G E T G M *
      80 caatg aagtg atgat gacc gttct gattt aacat tatat agtat tact tttt ttgtt taaat gtttt tcaat
      90 ttgat ttctg ttatt gtagt tctga taca taaat actaa ttat aaataaaaaaaaaaaaaaaaaa
      100

```

图4 厚壳贻贝抗菌肽 Mytilin-1 的 cDNA 基因全序列 (Genebank: FJ973154)

大写字母代表开放阅读框,相应的氨基酸序列置于核酸序列下方;下划线代表成熟肽序列,箭头代表成熟肽酶切位点;星号代表终止密码子

Fig. 4 The complete cDNA sequence of Mytilin-1 from *Mytilus coruscus* (Genebank: FJ973154)

The deduced amino acid sequence of the open reading frame is shown below the nucleotide sequence; The Arrows indicate the limits of the mature peptide; the asterisk indicates the stop codon

2  $\mu\text{mol/L}$ 左右<sup>[8]</sup>。为系统研究厚壳贻贝血清中的 Mytilin,可采取 3 步色谱分离法,即分别经两次反相 HPLC 和一次分子筛分离进行抗菌肽 Mytilin 的富集和检测,最终从厚壳贻贝血清中成功地分离到 3 种 Mytilin 抗菌肽。这 3 种抗菌肽 N 端序列相似性较高,属于同一家族,其中,厚壳贻贝 Mytilin-1 分子量为 3 885.17 u,由 34 个氨基酸残基组成,包括 8 个半胱氨酸,形成 4 对二硫键,其半胱氨酸的分布特征与其他贻贝的 Mytilin 一致。厚壳贻贝 Mytilin-1 的 cDNA 基因全长为 487 bp,其开放阅读框全长为 306 bp,编码一条总长为 102 个氨基酸残基的多肽,其 cDNA 序列与其他贻贝的 Mytilin 也具有很高的序列相似性,例如,来自地中海贻贝的 Mytilin-B 分子的 cDNA 序列全长 524 bp,其开放阅读框编码一条总长为 103 个氨基酸残基的前体多肽,包括 22 个氨基酸残基的信号肽区域以及 47 个氨基酸残基构成的

成熟肽后区域<sup>[14]</sup>。在 Mytilin 的 cDNA 序列中发现的成熟肽后区域通常富含酸性氨基酸(地中海贻贝 Mytilin-B 中含 11 个,而厚壳贻贝 Mytilin-1 中含 9 个),其功能目前尚不清楚。

通过在 NCBI 数据库中进行在线 BLAST 分析,我们发现厚壳贻贝抗菌肽 Mytilin-1 的氨基酸序列与来自地中海贻贝和紫贻贝的抗菌肽 Mytilin 家族成员具有较高的序列相似性,其相似性在 64% 到 72% 之间,特别是半胱氨酸的数量,位置以及碱性氨基酸的分布(如 R5, R13, R14, R26, R33 和 K30)存在高度保守性(图 3)。Romestand 等人通过对地中海贻贝的 Mytilin B 的空间结构研究认为,Mytilin 的 4 对二硫键有助于维持其三级结构的稳定性,而 Mytilin 中富含的碱性氨基酸对 Mytilin 的抗菌活性具有重要作用,特别是序列中的第 26 号精氨酸(R26)是 Mytilin 抗菌活性的关键残基<sup>[20]</sup>。厚壳贻贝 Mytilin-1 与其他贻贝的 Mytilin 存在的序列相似性特征预示着厚壳贻贝的 Mytilin-1 可能和地中海贻贝以及紫贻贝的 Mytilin 来自同一祖先分子,并具有相似的结构与功能。由于厚壳贻贝中 Mytilin 含量极低,因此,未能有足够的 Mytilin 样品进行深入的抗菌谱分析。但是,对厚壳贻贝 Mytilin 的初步抗菌活性测试表明,厚壳贻贝中 3 种 Mytilin 对革兰氏阳性菌和阴性菌均有抑制作用,这也与文献报道的其他贻贝的 Mytilin 的广谱抗菌活性类似。

以往的研究表明,多数抗菌肽分子都富含碱性氨基酸,这使得抗菌肽通常会带上净正电荷<sup>[21]</sup>,而原核细胞的细胞膜由于富含酸性脂质使其膜表面分布大量的负电荷,原核生物细胞膜的这一特征有助于带正电荷的抗菌肽与膜产生静电结合,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<sup>[22]</sup>。尽管贻贝抗菌肽的抗菌机制目前尚缺乏相关的实验证据,但已有的试验证据表明,贻贝 Mytilin 分子中富含的碱性氨基酸以及由此导致的高等电点与其抗菌功能具有重要关联<sup>[20]</sup>。从厚壳贻贝抗菌肽 Mytilin-1 的序列来看,该抗菌肽含有 11 个碱性氨基酸,其等电点(pI)为 10.26,因此,厚壳贻贝 Mytilin-1 有可能具有与其他阳离子抗菌肽相似的作用机制。目前,针对厚壳贻贝 Mytilin-1 的抗菌谱分析以及抗菌机制的研究仍在进行中。

## 参考文献:

- [1] Mcphee J B. Function and therapeutic potential of host defence peptides[J]. *J Peptide Sci*, 2005, 11: 677 – 687.
- [2] Lamb H M, Wiseman L R. Pexiganan acetate[J]. *Drugs*, 1998, 56: 1047 – 1052.
- [3] Broekaert W F, Terras F R, Cammue B P, *et al.* Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system[J]. *Plant Physiol*, 1995, 108: 1353 – 1358.
- [4] Iwanaga S, Kawabata S I, Muta T. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structure and functions[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 1 – 15.
- [5] Lehrer R I, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence[J]. *Curr Opin Immunol*, 1999, 11: 23 – 27.
- [6] Brogden K A, Ackermann M, McCray P B, *et al.* Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences[J]. *Int J Antimicrob*, 2003, 22: 465 – 478.
- [7] Hancock R W, Chapple D S. Peptide antibiotics [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43: 1317 – 1323.
- [8] 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.
- [9] Hubert F, Noel T, Roch P. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) [J]. *Eur J Biochem*, 1996, 240: 302 – 306.
- [10] 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.
- [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]. *Dev Comp Immunol*, 2000, 24(4): 381 – 393.
- [12] Mitta G, Hubert F, Noël T, *et al.* Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from hemo-cytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Eur J Biol Chem*, 1999, 274: 71 – 78.
- [13] Esser V M, Eifson D E. Experiences with the Kirby-Bauer method of antibiotic susceptibility testing[J]. *Am J Clin Pathol*, 1970, 54(2): 193 – 198.
- [14] Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, *et al.* Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(17): 12954 – 12962.
- [15] Dupuy J W, Bonami J R, Roch P. A synthetic antibacterial peptide from *Mytilus galloprovincialis* reduces mortality due to white spot syndrome virus in palaemonid shrimp [J]. *J Fish Dis*, 2004, 27 (1): 57 – 64.
- [16] Mitta G, Vandenbulcke F, Noël T, *et al.* Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel [J]. *J Cell Sci*, 2000, 113, (15): 2759 – 2769.
- [17] Mitta G, Vandenbulcke F, Roch P. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity [J]. *FEBS Lett*, 2000, 486: 185 – 190.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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: 2805 – 2813.
- [21] 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: 412 – 416.
- [22] Mcphee J B, Hancock R E W. Function and therapeutic potential of host defence peptides [J]. *J Peptide Sci*, 2005, 11: 677 – 687.

## Purification and identification of Mytilins from *Mytilus coruscus*

WANG Ri-xin<sup>1,2</sup>, LIU Mei<sup>2</sup>, LIAO Zhi<sup>2</sup>, LU Tao<sup>2</sup>, WU Mei<sup>2</sup>, HE Guang-yuan<sup>1\*</sup>

(1. China-UK HUST-RRes Genetic Engineering and Genomics Joint Laboratory, National Base of International Science and Technology Cooperation, Key Laboratory of Molecular Biophysics, Ministry of Education, Institute of Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;

2. Laboratory of Marine Biological Source and Molecular Engineering, Marine Science College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316004, China)

**Abstract:** The researches on antibacterial peptides from *Mytilus coruscus*, an important *Mytilus* in aquaculture, have significant value helping people to understand the mechanism of innate immune system of this mussel. Here, three peptides with antibacterial activity were purified from *Mytilus coruscus* serum by multi-dimensional high performance liquid chromatography (HPLC). The three peptides exhibited complementary antimicrobial properties against both gram-positive and gram-negative bacteria. The mass and the N-terminal sequences of these peptides were analyzed by a combination of Edman degradation and Mass Spectrometry. Based on the results of sequential BLAST, these antibacterial peptides from *Mytilus coruscus* serum belong to Mytilin family and are named Mytilin-1, Mytilin-2 and Mytilin-3, respectively; The molecular mass of these antibacterial peptides are 3885.17 u, 3993.26 u and 3991.39 u, respectively. Among them, Mytilin-1 was characterized as a 34-residues peptide including eight cystines formed four disulfides. The cDNA sequence coding for the Mytilin-1 precursor was obtained by screening PCR from the cDNA library of *Mytilus coruscus* blood cell. The precursor of Mytilin-1 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. This study lays the foundation for further research about the molecular diversity and the mechanism of these antibacterial peptides from *Mytilus coruscus* serum.

**Key words:** *Mytilus coruscus*; antibacterial peptide; Mytilin; cDNA

**Corresponding author:** HE Guang-yuan. E-mail: hegy@hust.edu.cn