

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00955

泥蚶金属硫蛋白的鉴定、原核重组表达及其组织细胞分布

解家松¹, 许婷¹, 刘玮², 何中央³, 吴信忠¹

1. 浙江大学 动物科学学院, 浙江 杭州 310029;

2. 宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211;

3. 浙江省水产技术推广总站, 浙江 杭州 310012

摘要: 采用 RT-PCR 方法扩增、克隆和鉴定了泥蚶(*Tegillarca granosa*)的金属硫蛋白(Metallothionein, MT)基因(*TgMT*)的开放阅读框(ORF)。基于金属硫蛋白氨基酸序列构建的系统进化树表明, 泥蚶和魁蚶(*Scapharca broughtonii*)的亲缘关系最近。利用 ORF 序列, 构建原核重组表达质粒。重组质粒经 PCR、酶切鉴定及测序验证后转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3), 经 IPTG 诱导, 表达重组蛋白, 重组蛋白的分子量约为 28.3 kD。可溶性分析表明重组蛋白主要以可溶性形式存在。用 His-tag 柱亲和纯化重组蛋白, 并利用重组蛋白制备了兔抗血清。Real-time PCR 和 Western blot 实验表明, 金属硫蛋白在泥蚶的各个组织中都有表达, 并且在消化腺中的表达量最高。采用激光共聚焦显微镜, 对泥蚶的消化腺进行免疫组化定位分析, 发现泥蚶的 MT 主要存在于消化腺腺管上皮细胞的胞质中。泥蚶 MT 的克隆和表达研究为进一步研究该蛋白在环境监测中的作用、探讨细胞解毒的分子生物学机制奠定了基础。

关键词: 泥蚶; 金属硫蛋白; 原核表达; 组织细胞分布

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)05-0955-10

泥蚶隶属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、列齿目(Taxodonta)、蚶科(Arcidae), 俗称血蚶、宁蚶、花蚶、粒蚶, 为广泛分布于印度洋与西太平洋沿岸的广温广盐性贝类。在中国, 主要分布于山东以南沿海, 是南方主要的经济养殖贝类^[1]。但近年来, 重金属对海洋生物, 尤其是底栖滤食性双壳贝类的污染愈来愈严重。抽样调查中发现, 贝类产品尤其是泥蚶重金属超标现象严重^[2-3]。泥蚶属于滤食性生物, 由于自身用于代谢的混合氧化系统存在缺陷, 与鱼类和甲壳类动物相比, 其体内污染物的释放较慢, 极易导致体内重金属含量较高^[4]。

金属硫蛋白(Metallothionein, MT)于 1957 年首次发现于马肾皮层细胞中^[5], 是一类普遍存在于生物体内的富含半胱氨酸、低分子量并能被重

金属诱导的金属结合蛋白。在生物体内, MT 的所有半胱氨酸均处于还原状态, 具有清除体内自由基、解除重金属的毒性、增强机体对各种不良状态适应能力等功能, 被认为是和生物体解毒有关的蛋白^[6-7]。MT 基因作为一种重要的免疫相关基因, 已有很多报道, 但主要集中于脊椎动物^[8-10]。直到 20 世纪 70 年代中期, 才首次报道了海洋无脊椎动物—美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)的 MT^[11]。近 30 年来, 已发现大多数无脊椎动物中都有 MT, 有关其结构和功能的研究已取得了较大进展^[12-13]。国外对贝类 MT 基因的研究主要集中在贻贝[如紫贻贝(*Mytilus edulis*^[12])]和牡蛎[如美洲牡蛎^[14]和太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[15]]。国内对大珠母贝(*Pinctada maxima*)^[16]、三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)^[17]和文蛤(*Meretrix meretrix*

收稿日期: 2011-01-04; 修订日期: 2011-01-21.

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(Y307606).

作者简介: 解家松(1986-), 男, 硕士研究生, 主要从事海洋生物分子免疫学研究. E-mail: xiejiasong@gmail.com

通信作者: 吴信忠(1957-), 教授, 博导, 从事海洋生物分子免疫及疾病防治. Tel: 0571-88982960; E-mail: wuxz@zju.edu.cn

Linnaeus)^[18]等也进行了相关研究,但有关泥蚶金属硫蛋白基因的鉴定、蛋白质原核表达和组织细胞定位方面的研究还未见报道。

本研究在获得泥蚶金属硫蛋白基因结构的基础上,构建含有泥蚶 *MT* 基因的重组表达质粒,导入大肠杆菌,实现了泥蚶重组 *MT* 蛋白体外的高效表达,并进一步确定了该蛋白在组织和细胞内的定位,为进一步研究 *MT* 在泥蚶体内的解毒机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

1.1.1 实验动物、菌株及试剂 泥蚶,壳长 2.2~2.5 cm,壳高 2.0~2.2 cm,体质量约 7.5 g,购自浙江温州产地和杭州水产品市场。

大肠杆菌感受态 DH5 α 、BL21(DE3)菌株和质粒 pET-32a 由本实验室保存;总 RNA 快速抽提试剂盒 RNAfast1000 购自飞捷(上海)生物技术有限公司;DNA Gel Extraction Kit、Plasmid Miniprep Kit 购自 Axygen 公司;PCR 试剂、SYBR®Premix Ex Taq™、M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit、pMD-19T 载体、T₄DNA 连接酶、限制性内切酶 *Xho* I、*Bam*H I 均购自 TakaRa 公司;PVDF 膜(0.22 μ m)为美国 Millipore 公司产品;DyLight 549 荧光标记山羊抗兔 IgG 抗体购自 PIERCE 公司;Hig-tag 抗体、羊抗兔 IgG-HRP 二抗、HRP/DAB 显色试剂盒购自天根公司;蛋白质纯化试剂盒购自 Novagen 公司,实验中所用其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 取泥蚶血淋巴液,1 000 g 离心获取血淋巴细胞,参照总 RNA 提取试剂盒说明书提取血淋巴细胞总 RNA,利用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计进行总 RNA 的定量和纯度分析。以抽提的总 RNA 为模板,以 Oligo (dT)₁₆ 为反转录引物,采用 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 反转录合成第一链 cDNA。

1.2.2 RT-PCR 和 PCR 产物的克隆及鉴定 根据 GenBank 中注册的泥蚶 *MT* 序列(AAS75318.1),

选择 pET32a 载体上合适的酶切位点设计引物,上游引物 P1: 5'-CAGGATCCATGTCTGACCCA TG TAAATG-3',下游引物 P2: 5'-GACCTCGAGTCAC TGGTT AC ACGGACA-3'。下划线部分分别表示 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。以 cDNA 链为模板,用引物 P1 与 P2 进行 PCR 扩增,反应条件为: 95℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 57℃ 45 s, 72℃ 45 s, 共 35 个循环;再 72℃ 下延伸 10 min。经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测得到约 230 bp 的扩增产物,将该条带在紫外线下切下,纯化回收 DNA 备用。

用 DNA Gel Extraction Kit 回收目的 PCR 产物片段,利用 T-A 克隆方法连接于 pMD-19T 载体,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在含 Amp(氨苄青霉素)的 LB 平板上初步筛选阳性克隆,培养过夜后,利用 Axygen 公司的 Plasmid Miniprep Kit 抽提质粒,然后用 PCR 和 *Bam*H I / *Xho* I 进行双酶切鉴定出阳性重组克隆 pMD19T-*MT*。

1.2.3 序列测定和分析 序列测定由上海英骏生物技术有限公司完成,用 BLASTp 于 GenBank 中进行相似性检索,再用 Clustal X 软件对相应的氨基酸序列进行分析,用 MEGA 4.0 软件构建泥蚶与其他 7 种双壳贝类 *MT* 氨基酸序列的系统进化树。

1.2.4 各组织器官中 *MT* 基因表达水平的定量分析 根据测序所获得的泥蚶 *MT* 的 cDNA 序列,设计定量 PCR 引物 Real-time primer F: 5'-TGCC GGCGATAACTGCCGAT-3', Real-time primer R: 5'-TGTCA CTGGTT ACACGGACACGA-3'。分别提取泥蚶血淋巴细胞、足肌、消化腺、鳃和外套膜共 5 种组织器官的总 RNA,并逆转录 RNA 为 cDNA 第一条链,每种组织各取自 3 个不同个体的样品。实时荧光定量 PCR 体系以 cDNA 第一条链为模板,以 β -actin 为内参基因, β -actin 的引物序列为 β -actin F: 5'-GACTCTGGTGATGGTGTCAC CCA-3', β -actin R: 5'-ATCTCCTTCTGCATTCTG TCGGC-3',定量表达分析通过 Bio-Rad iCycle IQ5 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad Laboratories Inc., 美国)完成。以泥蚶 *MT* 基因特异的引物进行定量 PCR 反应,每个反应体系包括: SYBR Premix Ex Taq (2 $\times$)

12.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ F、R 引物各 0.5 μL , cDNA 1 μL 模板, 无菌超纯水 10.5 μL , 总共 25 μL 体系。每个样品做3个重复样本。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 40 个循环。

PCR 反应结束后, 使用 Bio-Rad iCycle IQ5 荧光定量 PCR 仪自带软件包进行溶解曲线分析, 所得的数据应用相对 CT 法($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$)分析 *MT* mRNA 的组织表达^[19]。所有值均为 3 个反应的平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)。用 *t* 检验进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 认为差异显著, $P < 0.01$ 认为差异极显著。

1.2.5 重组质粒 pET32a-MT 的构建和转化 以阳性克隆 pMD19T-MT 为模板, 利用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增, 分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切扩增的 *MT* 基因和 pET32a 载体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切过夜。酶切后 *MT* 基因用 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收, pET32a 载体进行制备电泳, 用胶纯化试剂盒回收酶切产物。将纯化后的两者用 T₄DNA 连接酶连接 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

将 pET32a-MT 重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α , 以 P1 和 P2 为引物 PCR 筛选阳性菌株, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养并提取质粒, 经过 PCR 验证和 *Bam*H I / *Xho* I 双酶切验证, 确认基因已插入。用验证正确的重组质粒 5 μL 直接转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 涂布于 LB + Amp 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置过夜培养。

1.2.6 重组表达载体 pET32a-MT 在大肠杆菌中的表达 从上述平板上挑取 5 个分离较好的单菌落, 分别接入盛有 1 mL LB+Amp 液体培养基的离心管中, 阳性克隆经测序鉴定编码区正确后, 将表达菌株 pET32a-MT(BL21)置于 LB+Amp 培养基中过夜振荡培养。次日, 按照体积比 1 : 100 加入到 1 mL 同样的培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养。当菌种 OD₆₀₀ 达到 0.5 ~ 0.6 时, 分别加入 IPTG 至终浓度为 0、0.5 和 1.0 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 4 h, 12 000 r/min 离心 1 min, 收集菌体进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.7 重组表达蛋白的 Western blot 的鉴定 用电转仪(Bio-Rad)将 SDS-PAGE 胶中的蛋白转至 PVDF 膜上, 用封闭液(PBST + 5%脱脂奶粉)封闭

过夜, 再与鼠抗 His-tag 抗体室温反应 2 h, 用 PBST 洗膜 3 次后, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗(1 : 5 000), 室温反应 1 h 后洗膜 3 次, 最后用 HRP/DAB 显色试剂盒避光显色。

1.2.8 重组表达蛋白的可溶性分析及纯化 挑取表达菌株阳性单克隆在 LB+Amp 液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜振荡培养。次日, 按照体积比 1 : 100 加入到 200 mL LB+Amp 液体培养基中扩大培养, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 3 h 后, 当 OD₆₀₀ 达到 0.5 ~ 0.6 时, 再加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 4 h。诱导培养结束后, 取出 1 mL 菌液作为对照, 另外取 50 mL 菌液在合适的离心管中 12 000 r/min 离心 10 min 收集菌体沉淀, 菌体重悬于 10 mL 预冷的 PBS, 超声破碎菌体(300 W, 工作 5 s, 间歇 10 s, 共 8 min), 12 000 r/min 离心 10 min, 分别收集上清液和沉淀, 进行 12% SDS-PAGE 检测。

剩下的菌液同样经上述处理后, 将菌体破碎后的上清液过 His-Tag 亲和层析柱, 对表达产物进行分离纯化, 获得目的蛋白。

1.2.9 多克隆抗体的制备与效价检测 按 Bradford 法^[20]对蛋白进行定量, 然后取适量的蛋白进行多克隆抗体的制备。挑选健康的新西兰大白兔, 用纯化的重组蛋白作抗原加入佐剂, 采用多点背部皮下注射; 将 1 mg 抗原和等体积的完全弗氏佐剂充分乳化后用于初次免疫; 间隔 2 周后进行二次免疫, 免疫剂量为 0.5 mg 抗原加入等体积的不完全弗氏佐剂; 在间隔 1 周后用同样方法进行第 3 次和第 4 次免疫, 并在第 4 次免疫时, 耳动脉采血进行抗体效价检测。

采用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)的方法检测制备的多克隆抗体(一抗)的效价, 抗原为重组 pET32a-MT 纯化蛋白, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 显色底物为邻苯二胺(OPD)。设定空白血清为阴性对照, 样品血清为待测样品, 分别按 1 : 500、1 : 1 000、1 : 2 000、1 : 4 000、1 : 8 000、1 : 16 000 稀释, 测定 492 nm 处的光吸收值(OD₄₉₂)。根据同一稀释度样品血清与空白血清的 OD₄₉₂ 的比值确定最佳稀释度, 比值 > 2.1 即

为阳性, >2.1 或 <1.5 即为假阳性, <1.5 即为阴性。

1.2.10 组织蛋白的抽提与 Western blot 分析 取泥蚶各组织用 10 倍体积(*V/W*)的 PBS(含 1% NP40, 1% Triton, 0.1% SDS, 0.5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF)匀浆, 12 000 g/min 离心 5 min, 取上清液进行蛋白含量测定^[20], 按每个泳道 60 μ g 蛋白加样, 12% SDS-PAGE 电泳。电泳结束后用制备的多克隆抗体进行 Western blot 分析, 方法同 1.2.6。

1.2.11 MT 蛋白组织细胞定位研究 取泥蚶的消化腺, 4%多聚甲醛于 4℃固定过夜, 30%蔗糖溶液脱水至组织块沉底, OCT 包埋, 冰冻切片(Leica CM 3050S R404A)切片; 5%正常山羊血清封闭 2 h 后, 将 MT 抗体以 1:600 在 PBS 中稀释, 于 4℃孵育过夜; PBS 漂洗 2~3 次, 滴加 DyLight 549 荧光标记山羊抗兔 IgG 抗体(H+L)(PIERCE), 37℃孵育 30 min; DAPI 染色, 中性树脂封片, 各步骤间均用 pH 7.4 的 PBS 漂洗 2~3 次, 每次 5 min。在相同条件下, 以免疫前血清进行组织细胞免疫组化定位分析的对照。以 LSM 510 META 激光共聚焦显微镜进行组织细胞免疫组化定位分析。

2 结果与分析

2.1 泥蚶 MT 序列的测定与分析

从泥蚶血淋巴细胞中提取总 RNA, 经 RT-PCR 扩增后, 获得大小约为 230 bp 的条带。测序结果显示, 此序列全长 234 bp(去除引物序列), 编码 77 个氨基酸, 为泥蚶 MT 的完整开放阅读框, 该阅读框与 GenBank 中报道的泥蚶编码框(AAS75318.1)的序列完全相同。在推导的氨基酸序列中共有 21 个 Cys 残基, 它们与邻近的氨基酸组成了 8 个金属硫蛋白的保守性结构 Cys-X-Cys。该蛋白预测的分子量为 7.9 kD, 理论等电点为 7.76, 为碱性蛋白。Cys 含量 27.3%, Lys 含量为 14.3%, 不含芳香族氨基酸。使用 Clustal W 工具将泥蚶 MT 与其他 7 种双壳贝类 MT 氨基酸序列进行比较, 可以看出, 泥蚶 MT 与其他 7 种双壳贝类 MT 在 Cys 的排列方式上显示出较高的保守性(图 1)。

2.2 与其他动物 MT 蛋白的一致性及亲缘关系

与 GenBank 中登录的 7 种双壳贝类氨基酸序

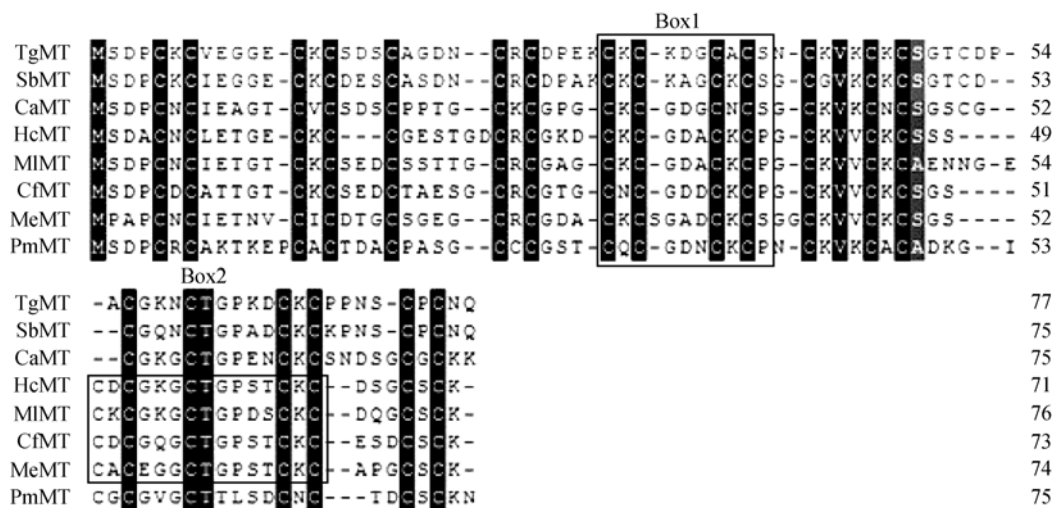


图 1 泥蚶与其他几种双壳贝类金属硫蛋白氨基酸的多序列比对结果

特征序列 Box 1、Box 2 以方框示出。图中所用 MT 序列在 GenBank 中的注册号为: TgMT, 泥蚶, AAS75318.1; SbMT, 魁蚶, ACH99846.1; CaMT, 近江牡蛎, ABC69708.1; HcMT, 三角帆蚌, ACS44750.1; MIMT, 丽文蛤, AAS92877.1; CfMT, 河蚬, ABM55725.1; MeMT, 紫贻贝, CAE11855.1; PmMT, 大珠母贝, ACJ22893.1。

Fig. 1 Alignment of amino acid sequences of metallothioneins in *Tegillarca granosa* and other bivalvia. The special regions (box 1 and box 2) in MT are flamed. GenBank accession numbers of the metallothioneins in the figure are as follows: TgMT, *Tegillarca granosa*, AAS75318.1; SbMT, *Scapharca broughtonii*, ACH99846.1; CaMT, *Crassostrea ariakensis*, ABC69708.1; HcMT, *Hyriopsis cumingii*, ACS44750.1; MIMT, *Meretrix lusoria*, AAS92877.1; CfMT, *Corbicula fluminea*, ABM55725.1; MeMT, *Mytilus edulis*, CAE11855.1; PmMT, *Pinctada maxima*, ACJ22893.1.

列进行比较发现, 泥蚶的 MT 与魁蚶的相似性最高, 达 82%; 其次是与近江牡蛎, 为 63%。这在一定程度上表明, 双壳贝类的亲缘关系越近, MT 氨基酸序列的相似性越高。此外, 还构建了双壳贝类 MT 的系统发育树(图 2), 结果表明蚶科与牡蛎科亲缘关系相距较近, 与蚬科和珍珠贝科相距较远。

2.3 MT 蛋白原核表达载体 pET32a-MT 的构建和鉴定结果

构建的 pET32a-MT 经酶切鉴定和测序表明其开放阅读框的序列完全正确, 如图 3 所示。

2.4 实时荧光定量 PCR 结果

采用 Real-time PCR 对 MT 基因在泥蚶不同组

织中的表达进行了定量分析。结果显示, 泥蚶 MT 基因在所有的组织中都有表达(图 4)。其中, 表达量最高的组织是消化腺; 其次是鳃、足肌、外套膜; 在血淋巴细胞中的表达量最低。

2.5 泥蚶 MT 重组蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达

将 pET32a-MT 质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)得到 BL21/pET32a-MT 重组菌, 发现经 IPTG 诱导后, 与未经诱导重组菌全菌蛋白电泳条带相比, 在相对分子质量约 28.3 kD 处有 1 条强蛋白带(图 5 A), 与预期相符, 说明 MT 融合蛋白成功表达。同时以 IPTG 诱导的含未重组质粒 pET32a 的

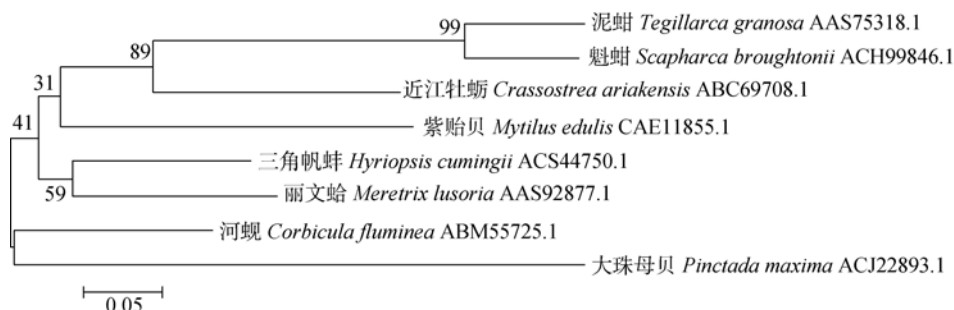


图 2 根据金属硫蛋白氨基酸序列构建的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic relationship based on deduced amino acid sequences of several MTs

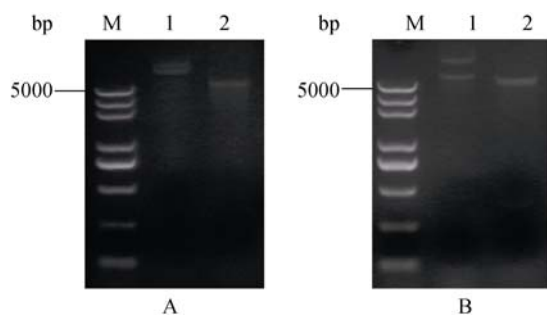


图 3 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切分析重组质粒 pET32a-MT 和质粒 pET32a

A: M. DNA 分子量标准; 1. pET32a-MT 重组质粒; 2. *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 pET32a-MT 重组质粒。

B: M. DNA 分子量标准; 1. pET32a 质粒; 2. *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 pET32a 质粒。

Fig. 3 Electrophoresis analysis of restriction enzyme digestion of recombinant plasmid pET32a-MT and plasmid pET32a
A: M. DNA marker; 1. recombinant plasmid pET32a-MT; 2. restriction enzyme digestion of pET32a-MT by *Bam*H I and *Xho* I.
B: DNA marker; 1. plasmid pET32a; 2. restriction enzyme digestion of pET32a by *Bam*H I and *Xho* I.

BL21 (DE3)菌体作对照, 在分子量约 20.4 kD 的位置有很强的蛋白带(图 5 B)。此外, 用 His-tag 抗体对重组表达蛋白进行鉴定检测发现, 经过 IPTG 诱导后的 pET32a-MT 和 pET32a 质粒均出现特异性条带, 而未经诱导的质粒中并未出现该特异性条带(图 6), 证明重组蛋白已在大肠杆菌 BL21(DE3)中成功表达。

2.6 MT 蛋白的可溶性分析及纯化

图 7 为重组 MT 蛋白可溶性的 SDS-PAGE 分析结果, 可见 MT 表达产物主要存在于细菌裂解液上清中, 只有少量存在于沉淀中, 大部分 MT 蛋白以可溶形式存在于细胞中。经过 His-Tag 柱进行亲和层析, 可得到纯净的目的蛋白。

2.7 多克隆抗体的效价检测和组织分布

兔抗泥蚶 MT 多克隆抗体经间接 ELISA 测定效价为 1 2 000。MT 在泥蚶各组织的表达分布用 Western blot 进行了检测(图 8)。从图 8 中可以看

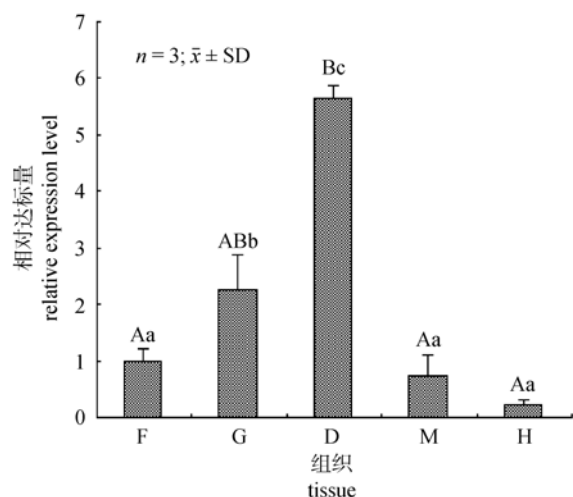


图 4 *MT* 基因在泥蚶不同组织中的荧光定量表达
F. 足肌; G. 鳃; D. 消化腺; M. 外套膜; H. 血淋巴细胞; 足肌为参照因子。大写字母表示组间差异极显著($P<0.01$); 小写字母表示组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 4 Expression level of *MT* gene in different fissus of *Te-gillarca granosa*
F. foot muscle; G. gill; D. digestive glands; M. mantle margin; H. hemocytes. The foot muscle was used as a control. Different capital letters donate extremely significant difference ($P<0.01$), and different small letters donate significant difference ($P<0.05$).

出, 在蛋白水平上 *MT* 在泥蚶的血淋巴细胞、鳃、消化腺、外套膜和足肌中都有表达, 在消化腺和鳃中的表达量较多, 而在血淋巴细胞和足肌中的

表达量相对较少, 这也进一步证明了实时荧光定量分析的结果。

2.8 泥蚶 *MT* 蛋白在组织细胞内的定位

采用激光共聚焦显微镜技术和免疫抗体组化定位的方法, 检测确定 *MT* 在泥蚶消化腺细胞内的定位, 其中蓝色信号为 DAPI 对细胞核的染色, 红色信号为兔抗血清与组织中金属硫蛋白的特异性结合位点。*MT* 在消化腺的腺管结构内侧呈现出较强的免疫反应信号, 而在腺管外侧的免疫反应信号较弱(图 9B), 同时用免疫前的兔血清做对照则呈现阴性结果(图 9A)。证明泥蚶 *MT* 蛋白主要集中于消化腺腺管结构的上皮中, 其细胞定位于上皮细胞的胞质中。

3 讨论

本研究从泥蚶中克隆得到了 *MT* 基因, 其完整的阅读框为 234 bp, 编码 77 个氨基酸, 泥蚶 *MT* 的氨基酸序列具有金属硫蛋白的典型特征, 序列中含 Cys 达 27.3%, 并且按照 *MT* 特征序列 Cys-X(1-3)-Cys 排列, Gly 的含量也非常高, 达 9.1%, 这也是软件动物 *MT* 的特征之一^[21], 同时不含芳香族氨基酸。与其他无脊椎动物的 *MT* 一

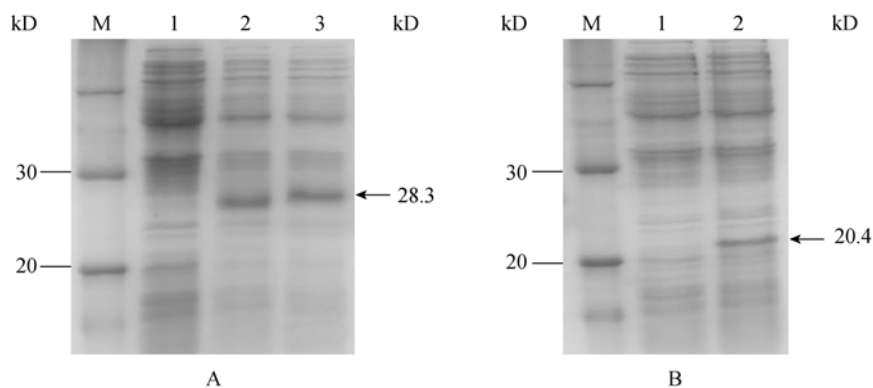


图 5 pET32a-MT(A)和 pET32a(B)在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达的 SDS-PAGE 分析

A: M. 低分子标准蛋白; 1. BL21/pET32a-MT 未经诱导的全菌蛋白; 2-3. BL21/pET32a-MT 分别经 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L IPTG 诱导的全菌蛋白。

B: M. 低分子标准蛋白; 1. BL21/pET32a 未经诱导的全菌蛋白; 2. BL21/pET32a 经 1.0 mmol/L IPTG 诱导的全菌蛋白。

Fig.5 SDS-PAGE analysis of pET32a-MT(A)and pET32a(B) expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3)

A: M. protein marker; 1. recombinant BL21/pET32a-MT without induction; 2-3. recombinant BL21/pET32a-MT induced by 0.5 mmol/L and 1.0 mmol/L IPTG, respectively. B: M. protein marker; 1. recombinant BL21/pET32a without induction; 2. recombinant BL21/pET32a induced by 1.0 mmol/L IPTG.

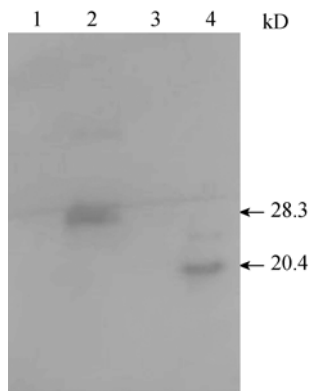


图 6 pET32a-MT 和 pET32a 在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达的 Western blot 分析

1. BL21/pET32a-MT 未经诱导的全菌蛋白; 2. BL21/pET32a-MT 经 1.0 mmol/L IPTG 诱导的全菌蛋白; 3. BL21/pET32a 未经诱导的全菌蛋白; 4. BL21/pET32a 经 1.0 mmol/L IPTG 诱导的全菌蛋白.

Fig.6 Western blot analysis of pET32a-MT and pET32a expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) using His-tag antibody

1. recombinant BL21/pET32a-MT without induction;
2. recombinant BL21/pET32a-MT induced by 1.0 mmol/L IPTG;
3. recombinant BL21/pET32a without induction;
4. recombinant BL21/pET32a induced by 1.0 mmol/L IPTG.

样, 泥蚶 MT 富含 Cys-X(1-3)-Cys 结构, 其中 8 个 Cys-X-Cys 结构, 1 个 Cys-X-X-Cys 结构, 6 个 Cys-X-X-X-Cys 结构, 这些 Cys 位置及排列方式

在软体动物之间是保守的。这些结构中的 Cys 为金属结合的位点, 其巯基能共价结合金属离子, 如 Zn、Cu 和 Cd 等重金属。无脊椎动物和软体动物金属硫蛋白有 1 个保守特征序列 C-K-C-X(3)-C-X-C-X^[22], 在泥蚶 MT 中也有 1 段序列符合此模式(图 1, Box 1)。软体动物金属硫蛋白 C-末端有 1 个保守的特征序列 C-X-C-X(3)-C-T-G-X (3)-C-X-C-X (3)-C-X-C-K^[23], 泥蚶的 C 端并不完全符合这一特征, 但在与泥蚶 MT 比对的 7 种双壳贝类中, 三角帆蚌、丽文蛤、河蚌和紫贻贝 MT 序列的 C 端却有完全符合这一特征的序列(图 1, Box 2), 这可能与软体动物金属硫蛋白的多样性有关。

在分子生物学的研究中, 目的基因在大肠杆菌中的高效表达和大量靶蛋白获得后的纯化是一项关键技术。为了能够得到纯度高的目的蛋白, 通常将目的基因带上标签, 通过亲和层析达到纯化的目的。载体 pET32a 含有 1 对 6 个组氨酸组成的多肽, 相对分子质量小, 没有免疫原性, 对目的基因的功能影响小^[24], 能够通过组氨酸融合蛋白亲和和镍柱纯化得到高纯度的靶蛋白。利用泥蚶 MT cDNA 的 ORF 序列构建原核表达载体 pET32a-MT, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)后, 经

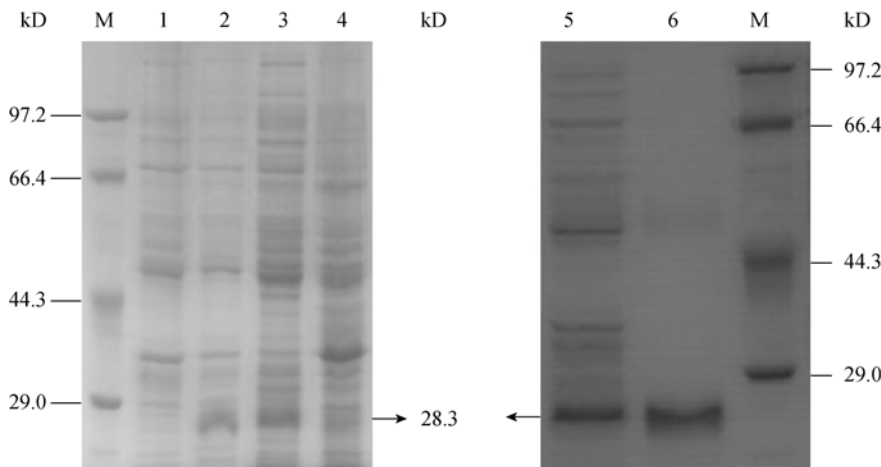


图 7 pET32a-MT 在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达的可溶性分析及纯化结果

M: 蛋白分子量标准; 1: BL21/pET32a-MT 未经诱导的全菌蛋白; 2, 5: BL21/pET32a-MT 经 1.0 mmol/L IPTG 诱导的全菌蛋白; 3: BL21/pET32a-MT 经 IPTG 诱导裂解后上清; 4: BL21/pET32a-MT 经 IPTG 诱导裂解后沉淀; 6: 纯化的 BL21/pET32a-MT 表达蛋白.

Fig.7 Soluble analysis and purification result of pET32a-MT expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3)

M: protein marker; 1: recombinant BL21/pET32a-MT without induction; 2,5: recombinant BL21/pET32a-MT induced by 1.0 mmol/L IPTG; 3: supernatant liquor of BL21/pET32a-MT lysis product after induction of IPTG; 4: sedimentation of BL21/pET32a-MT lysis product after induction of IPTG; 6: recombinant BL21/pET32a-MT after purification.

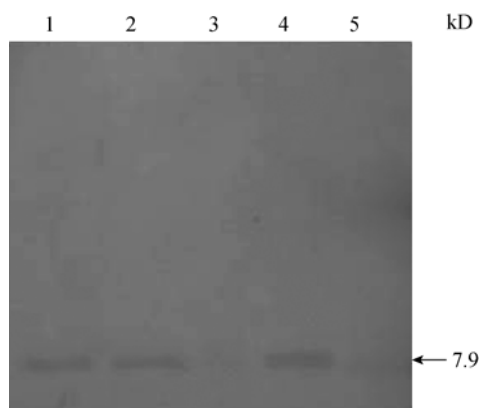


图 8 MT 基因在泥蚶各组织中表达的 Western blot 分析

1. 外套膜; 2. 鳃; 3. 足肌; 4. 消化腺; 5. 血淋巴细胞.

Fig.8 Western blot analysis of MT gene in various tissues of *Tegillarca granosa*

1. mantle margin; 2. gill; 3. foot muscle; 4. digestive gland; 5. hemocyte.

IPTG 诱导后获得重组融合 MT。此外, 在重组表达时选用 pET32a 质粒, 是因为泥蚶 MT 的分子量太小, 加上标签的融合蛋白更容易制备高特异性的多克隆抗体。本研究获得了高纯度和特异性的多克隆抗体, 这为进一步探索 MT 在泥蚶中的免疫反应的作用机理奠定了基础。

在本研究中, 应用间接免疫荧光组织化学染

色后, 泥蚶消化腺腺管上皮组织细胞 MT 蛋白被标记上荧光素。不同波长的荧光素被激光共聚焦显微镜上的激光管激发后, 荧光数量的变化可以用显微镜自带的分析软件分析, 从而准确定量消化腺腺管上皮细胞中 MT 蛋白的细胞分布。用制备好的兔抗 MT 血清来检测不同组织中 MT 的表达情况, 通过 Real-time PCR 和 Western blot 实验发现, MT 在泥蚶的鳃、消化腺、外套膜、足肌、血淋巴细胞中都有表达, 在消化腺中的表达量明显高于其他组织。消化腺是软体动物主要的参与解毒过程和清除异生物质的代谢调节中心^[25]。消化腺管的上皮细胞主要由消化细胞和嗜碱性细胞组成^[26], 其中占主导地位的消化细胞主要进行细胞内消化, 同时它具有完整的内溶酶体系统, 而少量的嗜碱性细胞主要是分泌细胞, 主要进行细胞外的消化和代谢调节^[27]。目前普遍认为, 金属硫蛋白主要的生理功能是稳态调节细胞内金属水平, 即参与生物体内必需金属元素的代谢和非必需金属元素的解毒^[28]。本研究发现泥蚶的消化腺由许多腺管状结构组成, 而 TgMT 主要定位于消化腺消化管上皮细胞的胞质内, 说明泥蚶 MT 可能与消化细胞的解毒功能有关。

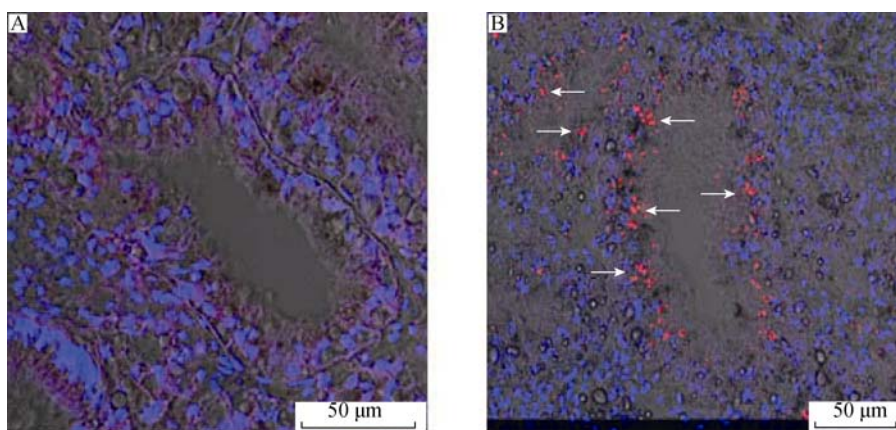


图 9 泥蚶 MT 蛋白在消化腺上皮细胞内的免疫标记定位

A 为阴性对照; B 图中箭头标识为免疫反应信号.

Fig. 9 Immunohistochemical labelling in digestive glands of *Tegillarca granosa* with the antibody against TgMT
A is negative control showing no immunostaining signal. B shows the presence of TgMT in cytoplasm (arrows).

参考文献:

[1] 王日昕, 李太武, 吕振明, 等. 泥蚶 (*Tegillarca granosa*) 不同地理居群同工酶变异及遗传分化的研究[J]. 海洋与湖泊, 2005, 36(3): 227-234.

[2] 唐以杰, 钟诚, 陈明旺, 等. 海陵岛沿岸经济贝类体内重金属含量及食用安全分析[J]. 中国现代医药科技, 2004, 4(3): 8-10.

[3] 陈玲, 傅晖蓉, 曾志定. 泉州市贝类产品中重金属元素污染情况分析[J]. 检验医学与临床, 2004, 1(2): 62-63.

- [4] 蔡立哲, 刘琼玉, 洪华生. 菲律宾蛤仔在高浓度锌铅水体中的金属积累[J]. 台湾海峡, 1998, 17(4): 456–461.
- [5] Margoshes M, Vallee B L. A cadmium protein from equine kidney cortex [J]. J Am Chem Soc, 1957: 4813–4814.
- [6] Vallee B L. Introduction on metallothionein [J]. Methods Enzymol, 1991, 205: 3–7.
- [7] Roesijadi G. Response of invertebrate metallothioneins and MT genes to metals and implications for environmental toxicology [Z]//Suzuki K T, Imura N, Kimura M. Metallothionein III. Basel: Birkhauser Verlag, 1993: 141–158.
- [8] Reeve V E, Nishimura N, Biosnic M, et al. Lack of metallothionein- I and -II exacerbates the immunosuppressive effect of ultraviolet B radiation and cis-urocanic acid in mice [J]. Immunology, 2000, 100(3): 399–404.
- [9] 闫学春, 孙效文, 梁利群, 等. 金属硫蛋白基因对转基因鲤及实验动物体内重金属累积的影响[J]. 水产学报, 2005, 29(2): 281–284.
- [10] 路延笃, 黄巧云, 陈雯莉, 等. 猴金属硫蛋白 α 域(MT- α cDNA)突变体的构建、表达及工程菌对重金属的吸附[J]. 环境科学学报, 2008, 28(9): 1763–1770.
- [11] Ridlington J W, Fowler B A. Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from the American oyster (*Crassostrea virginica*) [J]. Chemico-Biol Interact, 1979, 25(2/3): 127–138.
- [12] Lemoine S, Laulier M. Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination [J]. Mar Poll Bull, 2003, 46(11): 1450–1455.
- [13] Rebelo M, Pfeiffer W, Silva H, et al. Cloning and detection of metallothionein mRNA by RT-PCR in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) [J]. Aquat Toxicol, 2003, 64(3): 359–362.
- [14] Butler R A, Roesijadi G. Metallothionein (MT) gene expression and cadmium-induced immunotoxicity in hemocytes of the eastern oyster *Crassostrea virginica* [J]. Mar Environ Res, 2000, 50: 470.
- [15] Moraga D, Tanguy A. Genetic indicators of herbicide stress in the Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) under experimental conditions [J]. Environ Toxicol Chem, 2000, 19(3): 712–718.
- [16] 唐仁生, 夏建红, 王玉梅, 等. 大珠母贝金属硫蛋白 cDNA 克隆与序列特征分析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(7): 2888–2890, 2900.
- [17] 袁一鸣, 汪桂玲, 李家乐. 三角帆蚌金属硫蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 动物学杂志, 2009, 44(5): 98–104.
- [18] 高祥刚, 赫崇波, 李云峰, 等. 文蛤金属硫蛋白基因的克隆与分析[J]. 水产学杂志, 2009, 22(4): 8–11.
- [19] Zhang D C, Jiang J J, Jiang S G, et al. Molecular characterization and expression analysis of a putative LPS-induced TNA- α factor (LITAF) from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27: 391–396.
- [20] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248–254.
- [21] Engelken J, Hildebrandt A. cDNA cloning and cadmium-induced expression of metallothionein mRNA in the zebra mussel *Dreissena polym orphan* [J]. Biochem Cell Biol, 1999, 77: 237–241.
- [22] Imagawa M, Onozawa T, Okumura K, et al. Characterization of metallothionein cDNAs induced by cadmium in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Biochem J, 1990, 268: 237–240.
- [23] Binz P A, Kagi J H R. Metallothionein: molecular evolution and classification in metallothionein [C]. 4th International Metallothionein Meeting (MT-97). Basel: Birkhauser, 1999, 27: 7–13.
- [24] 杨道理, 李保昌. 蛋白质纯化的方法选择[J]. 实用医药杂志, 2004, 21(12): 1121–1123.
- [25] Moore M N, Allen J I. A computational model of the digestive gland epithelial cells of marine mussels and its simulated responses to oil-derived aromatic hydrocarbons [J]. Mar Environ Res, 2002, 54: 579–584.
- [26] Morton B. Feeding and digestion in Bivalvia[M]//Saleuddin A S M, Wilburg M. Mollusca. New York: Academic Press, 1983, 5: 65–147.
- [27] Marigómez I, Soto M, Cajaraville M P, et al. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs [J]. Microsc Res Tech, 2002, 56: 358–392.
- [28] Coyle P, Philcox J C. Metallothionein: The multipurpose protein [J]. Cell Mol Life Sci, 2002, 59: 627–647.

Identification and subcellular distribution of metallothionein from *Tegillarca granosa*

XIE Jiasong¹, XU Ting¹, LIU Wei², HE Zhongyang³, WU Xinzhong¹

1. College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

3. Fisheries Technical Extension Center of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China

Abstract: Metallothioneins (MTs) are low molecular weight, cysteine-rich, metal-binding proteins. MTs are thought to be involved in the cellular detoxification of metals (e.g., Cd and Hg) and homeostasis of essential metal ions (e.g., Zn and Cu) in mammals. However, little is known about the functions of MT in bivalves. We cloned the cDNA encoding metallothionein of *Tegillarca granosa* (TgMT) using RT-PCR. The open reading frame (ORF) of TgMT was 234 bp encoding a polypeptide of 77 amino acids with a predicted molecular mass of 7.9 kD. Phylogenetic analysis suggested that TgMT was most closely related to MT from *Scapharca broughtonii*. We constructed a recombinant expression plasmid (pET32a-MT) by inserting the TgMT ORF into the prokaryotic expression vector pET-32a. The recombinant TgMT was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3) following induction with IPTG. SDS-PAGE analysis confirmed the expression of TgMT, which had a molecular mass of about 28.3 kD, in agreement with the expected molecular weight. The recombinant protein was primarily expressed as a soluble protein and was purified by Ni-NTA His-Bind Resin. We injected the purified TgMT into rabbits to obtain polyclonal antiserum against TgMT for use in immunoblotting experiments. Real time PCR and western blot analysis revealed that TgMT was distributed ubiquitously in a range of tissues. Expression was highest in the digestive glands of *T. granosa*. We performed immunohistochemistry using a laser confocal microscope to examine the cell distribution of TgMT in the digestive gland. TgMT was primarily localized in the cytoplasm of the digestive tubule epithelium. Our results provide insight into the utility of using MT proteins for environmental monitoring and into the mechanisms controlling detoxification in *T. granosa*.

Key words: *Tegillarca granosa*; metallothionein; prokaryotic expression; tissue and cell distribution

Corresponding author: WU Xinzhong. E-mail: wuxz@zju.edu.cn