

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00983

双齿围沙蚕金属结合蛋白(MP II)基因克隆与表达

杨大佐¹, 周一兵¹, 陈雪¹, 周笑孝¹, 王斌¹, 袁秀堂², 孙静波³

1. 辽宁省海洋生物资源恢复与生境修复重点实验室, 大连海洋大学, 辽宁 大连 116023;
2. 国家海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023;
3. 宝生物工程(大连)有限公司, 辽宁 大连 116600

摘要: 根据已知杂色沙蚕(*Nereis diversicolor*)金属结合蛋白 II (MP II)部分基因序列设计引物, 应用 RACE 技术从双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis*)中克隆得到 MP II cDNA 序列全长为 904 bp, 其中, 开放阅读框为 357 bp, 编码 119 个氨基酸。Blast 比对结果显示, 由双齿围沙蚕 MP II cDNA 序列推导的氨基酸序列与多毛类 *Periserrula leucophryna* 蚯蚓血红蛋白(Hr)、杂色沙蚕(*Nereis diversicolor*)蚯蚓肌血红蛋白(MHr)及星虫类 *Themiste zostericola* Hr 氨基酸序列的同源性分别为 81.51%、77.12%和 61.02%, 由此推断该 cDNA 序列可能属于血红蛋白家族。应用 Real-time PCR 方法, 分别研究了沙蚕暴露于 Cd²⁺质量浓度为 40 mg/L 的环境中 12、24、48 和 72 h 后 MP II 基因表达水平的变化, 以及 3 种质量浓度 5、10 和 20 mg/L Cd²⁺暴露 15 d 后 MP II 基因的表达水平。实验结果表明: (1)沙蚕暴露于 40 mg/L Cd²⁺ 72 h 后, MP II mRNA 表达量显著增加, 为空白对照组的 12.6 倍, 表现出极显著差异($P < 0.01$); (2)不同质量浓度 Cd²⁺诱导 15 d 后, 各组 MP II mRNA 表达量均呈显著升高($P < 0.05$), 达到空白对照组的 4.8 倍以上, 且随 Cd²⁺浓度增大, MP II mRNA 表达量增加。据此认为, MP II 对 Cd²⁺的应激调控发生于转录水平。本研究为海洋沉积环境早期污染的生态风险预测提供了分子生物学依据。

关键词: 双齿围沙蚕; MP II cDNA; RACE; Cd²⁺; real-time PCR

中图分类号: Q78; S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)05-0983-09

多毛类(Polychaete)作为海洋底栖动物优势类群, 具有特殊的生态学特性, 一方面, 其做为重要的饵料生物, 是海洋生态系统能量流动与物质循环的关键环节^[1]; 另一方面, 由于其具有体型大、生命周期长、行动缓慢、分布广泛、对重金属等持久性污染物耐受和富集能力较强^[2-4]等特征, 一直被作为海洋沉积环境污染评价的指示生物和毒理研究模型动物。例如, Bryan 等^[5]发现杂色沙蚕(*Nereis diversicolor*)暴露于 Cd²⁺中 192 h LC₅₀ 达到 100 mg/L, 远超过一般海洋无脊椎动物 0.1 ~ 10 mg/L 的耐受范围^[6]。有研究表明, 在沉积环境中, 杂色沙蚕对锌和镉的耐受值分别可达到

100 ~ 3 000 µg/g 和 0.2 ~ 9.3 µg/g, 体内蓄积量亦可分别达到 130 ~ 350 µg/g 和 0.08 ~ 3.6 µg/g^[2]。已有许多资料证实, 几乎所有脊椎动物和大多数无脊椎动物, 经重金属诱导后均能合成大量金属硫蛋白, 参与细胞内金属水平的稳态调节、重金属解毒以及清除自由基等生物学功能。多毛类杂色沙蚕暴露于镉后可形成金属结合蛋白, 从氨基酸组成可认为其是类似于血红蛋白(hemerythrin, Hr)或肌红蛋白(myohemerythrin, Mhr)家族的呼吸蛋白, 称为 MP II, 主要承担长期慢性重金属暴露条件下的解毒作用。MP II 不仅能够与镉相结合, 而且还具有与锌和铜结合的能力^[7]; 同时具有明显

收稿日期: 2011-01-05; 修订日期: 2011-05-03.

基金项目: 国家科技部 863 项目(2006AA10Z410); 国家海洋公益性行业科研专项经费资助项目(200805069); 国家科技部农业科技成果转化资金项目(2009GB2B000063); 国家自然科学基金项目(30901107).

作者简介: 杨大佐(1979-), 男, 博士研究生, 助理研究员, 主要从事海洋生物修复技术研究. E-mail: dzyang@dlou.edu.cn

通信作者: 周一兵, 教授. Tel: 0411-84762791; E-mail: ybzhou@dlou.edu.cn

的抗菌活性^[8]。但这些研究主要集中于 *MP II* 蛋白水平的检测和分析, 对于其功能特征、调节机理至今还不明确, 尤其是有关 *MP II* 基因的克隆和表达研究尚未见报道。

因此, 本研究以广泛分布于中国沿岸河口滩涂的优势大型多毛类—双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis*)为研究对象, 采用 RT-PCR 和 RACE 法, 首次克隆得到双齿围沙蚕 *MP II* 基因的全长 cDNA 序列; 在此基础上, 选择 Cd^{2+} 作为重金属诱导剂, 应用荧光实时定量 PCR 技术研究该基因在 Cd^{2+} 暴露条件下 *MP II* mRNA 表达水平的变化, 为探讨重金属对沙蚕 *MP II* 基因表达、调控的作用机理提供依据, 亦为筛选海洋沉积环境污染早期生态风险预测的分子生物标志物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

研究用双齿围沙蚕于 5 月份大潮期采自辽宁省盘锦双台子河口潮滩沉积质, 采捕时海水盐度为 31.7, pH 值为 7.84, 温度为 16.5℃。采集后将实验动物放置加冰泡沫保温箱内运送到辽宁省海洋生物资源恢复与生境修复重点实验室。暂养于聚乙烯水族箱中(50 cm×40 cm×40 cm), 暂养期间投喂牙鲆人工合成饵料(13.0%水分, 44.7%粗蛋白, 26.1%粗脂质和 10.8% 灰分), 暂养 1 周后挑选大小一致、身体无伤、活力好的沙蚕开始实验, 每 24 h 全量更换海水 1 次。

1.2 总 RNA 提取

取双齿围沙蚕体壁肌肉 0.1 mg, 迅速投入装有液氮预冷的研钵中, 经液氮速冻研磨成细粉, 再按照 RNAiso Plus (宝生物工程(大连)有限公司)说明书提取总 RNA, 最终溶于 DEPC 处理水。将已溶解的 RNA 于-80℃保存, 或者经反转录后得到的 cDNA 第一链于-20℃保存。

1.3 特异性片段扩增和 RACE 扩增

根据已知杂色沙蚕(*Nereis diversicolor*)*MP II* 部分基因序列(S57799)设计合成 1 对引物 F、S(表 1); 以双齿围沙蚕总 RNA 为模版, RT-PCR 扩增出长度为 277 bp 的特异性片段。RT-PCR 反应参照

TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0[(宝生物工程(大连)有限公司)], 反应条件: 30℃, 10 min; 42℃ 30 min; 99℃ 5 min; 5℃ 5 min。

根据 RT-PCR 扩增出的 277 bp 序列设计并合成 3' RACE 和 5' RACE 的特异性引物(表 1); 参照 TaKaRa 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0、TaKaRa 5'-Full RACE Kit 试剂盒说明书进行[宝生物工程(大连)有限公司]。3' RACE 反应条件: 94℃ 3 min; 30 循环(94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 1 min 30 s); 72℃ 10 min; 94℃ 3 min; 30 循环(94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 1 min); 72℃ 10 min。5' RACE 反应条件: 94℃ 3 min; 30 循环(98℃ 15 s, 62℃ 30 s, 72℃ 1 min 30 s); 72℃ 10 min; 94℃ 3 min; 30 循环(98℃ 15 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min 10 s); 72℃ 10 min。PCR 产物于 4℃ 保存, 取 5 μL PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外成像仪中检测。序列测定由宝生物工程(大连)有限公司完成。

表 1 实验所用的引物序列		
Tab.1 Sequences of primers used in the experiment		
引物 primer		序列(5'-3') sequence(5'-3')
PCR	F	CGAGTCCTTCAGGTCTTC
	S	TCGGTCTTCTTCTTGTGGG
5'-RACE PCR	F1	CATCCTTGAAGTG GTTGGCAGTA
	S1	CTTGAGGTTGTAGCGTTGTTTC
3'-RACE PCR	F2	TGGAAACAACGCTAACAACTCA
	S2	ACCACTTCAAGGATGAGGAGGGC
RT-PCR for <i>MP II</i>	F3	CGTCAACCACATCAAGGGAAC
	S3	CCCCTGAAACGACACTAACA
RT-PCR for β -actin	F4	GGGCTACTCCTTACCACCA
	S4	CGAAGTCCAGAGCAACATAGCA

1.4 序列拼接与分析

所得序列拼接后, 进行序列同源性分析, 并将其翻译为氨基酸序列, 即分别应用 BLAST 进行同源搜索, CLUSTAL W 1.83 进行多重序列比对, MEGA 软件构建进化树, SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)分析信号肽序列, PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite>)分析序列的功能位点, 以及 SOMPA(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma).

html)预测蛋白的二级结构组成。

1.5 Cd^{2+} 暴露下 *MP II* 基因表达量的检测

实验所用海水采自大连市黑石礁海区, 经沉淀、砂滤后贮存储备用。实验海水的 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 质量浓度分别为 0.38、0.01、75、0.27 和 0.06 $\mu\text{g/L}$; 盐度为 31~32; pH 值为 8.25 ± 0.10 ; 温度为 $(18 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。

根据作者之前进行的急性毒性实验结果, 获得 96 h LC_{50} 半致死浓度为 120 mg/L , 设置沙蚕在 40 mg/L Cd^{2+} 质量浓度下, 分别于实验开始后的 12、24、48 和 72 h 检测 *MP II* 基因表达水平的变化; 以及沙蚕于 3 种质量浓度(5、10 和 20 mg/L) Cd^{2+} 下暴露 15 d 后 *MP II* 基因的表达水平。上述实验均设置空白对照组(cb), 且每组设置 5 个重复。实验于 2 L 聚乙烯塑料烧杯内进行, 每个烧杯中放 6 尾沙蚕, 每 24 h 更换实验海水 1 次, 以保持实验液中 Cd^{2+} 浓度的稳定。实验开始后分别于 12 h、24 h、48 h、72 h 和 15 d 时, 各处理组及空白对照组随机选取 3 尾沙蚕, 取 0.1 mg 体壁组织提取总 RNA, 冻存于 -80°C 待检测。

提取各组样品的总 RNA, 采用 SYBR Green I 染料法, 在 TaKaRa Thermal Cycler Dice Real Time System 荧光定量 PCR 仪上进行扩增和数据分析。依照 TaKaRa SYBR[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit (Perfect Real Time) [宝生物工程(大连)有限公司]试剂盒说明书进行 RT 和 PCR 反应。RT 反应条件: 37°C 15 min; 85°C 5 s。PCR 反应条件: 95°C 10 s; 45 循环(95°C 5 s, 56°C 10 s, 72°C 15 s)。以对照组样品的总 RNA 为标准品, 将 RNA(100 ng)反转录获得的 cDNA 用 EASY Dilution 按 10 倍梯度(1、10、 10^2 、 10^3 、 10^4 倍)稀释作为模板, 分别制作管家基因(β -actin)和目的基因(*MP II*)的标准曲线, 并对样品进行定量。90%以上 RT-PCR 最常用的内参基因中包括 β -actin, β -actin 广泛分布于细胞浆内, 表达量非常丰富且相对恒定, 但 β -actin 当细胞向恶性转化时其 mRNA 的表达水平增加, 而假基因的存在也可干扰 β -actin 的检测^[9]。作者在预实验中, 将空白对照组与各处理组总 RNA 浓度进行标准化, 再对 β -actin 基因运用 RT-PCR 方

法检测, 结果表明 β -actin mRNA 表达未受重金属污染的影响, 故本研究可以采用 β -actin 作为内参基因。

1.6 数据分析

对实验结果数据采用 SPSS13.0 统计软件进行方差分析(ANOVA), 显著性水平为 $P < 0.05$; 并采用 Duncan's 方法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 双齿围沙蚕 *MP II* cDNA 序列全长的获得

根据已知杂色沙蚕(*N. diversicolor*)金属结合蛋白(*MP II*)部分基因序列设计引物, 采用逆转录聚合酶链式反应技术, 扩增获得双齿围沙蚕(*Perinereis aibuhitensis*)部分 *MP II* cDNA 序列, 并以该部分序列设计引物, 通过优化 PCR 反应条件, 应用 3' RACE 方法由双齿围沙蚕体壁肌肉总 RNA 扩增获得到 1 段 599 bp 核苷酸序列(图 1); 5' RACE 扩增获得到 243 bp 核苷酸序列(图 2)。根据 5' RACE、3' RACE 的结果, 与 201 bp 的已知双齿围沙蚕 *MP II* 基因片段拼接, 得到 904 bp 完整的双齿围沙蚕 *MP II* cDNA 序列全长。

2.2 序列分析

序列分析表明, 双齿围沙蚕 *MP II* cDNA 包括 81 bp 的 5'非翻译区和 463 bp 的 3'非翻译区, 开放

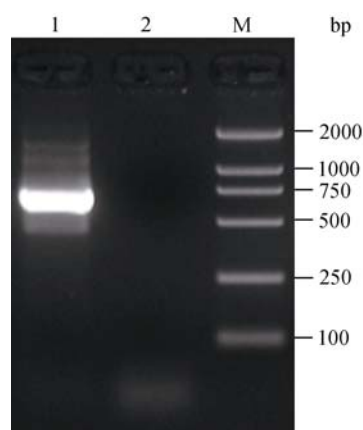


图 1 双齿围沙蚕 *MP II* 3' RACE 扩增产物的电泳检测
M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: 3' RACE PCR 产物;
2: M-MLV(-)对照。

Fig.1 3' RACE amplification product of *MP II*
M: DL2000 DNA marker; 1: PCR product of 3' RACE;
2: RT-PCR product of M-MLV (-).

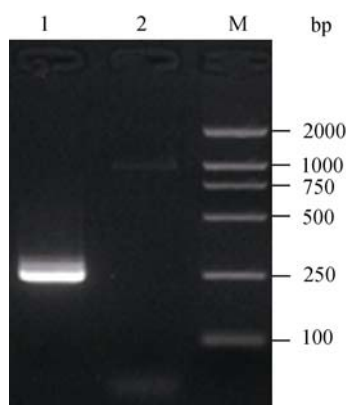


图 2 双齿围沙蚕 *MP II* 5' RACE 扩增产物的电泳检测
M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: 5' RACE PCR 产物;
2: M-MLV(-)对照.

Fig.2 5' RACE amplification product of *MP II*
M: DL2000 DNA marker; 1: PCR product of 5' RACE;
2: RT -PCR product of M-MLV (-).

阅读框为 357 bp, 编码 119 个氨基酸(图 3)。由图 3 可见, 双齿围沙蚕 *MP II* cDNA 推导的氨基酸组成中, 半胱氨酸含量仅为 0.84%, 天门冬氨酸

和谷氨酸含量为 17.64%, 芳香族氨基酸含量为 13.44%, 组氨酸含量为 4.2%, 这些特征与哺乳动物和许多无脊椎动物金属硫蛋白(MT)存在较大差异。蛋白质预测的分子量约为 13.9 kD, 理论等电点 6.0。利用 SignalP 对 *MP II* 蛋白序列在线搜索, 发现该蛋白存在信号肽的概率极低, 不存在信号肽酶切位点, 是一种非分泌蛋白。跨膜性分析(TMhMM)显示, 双齿围沙蚕 *MP II* 无明显跨膜区域。利用 PROSITE 在线工具分析该蛋白结构域, 表明该蛋白含有蚯蚓血红蛋白的特征基序 $HX_{29}HX_3EX_{16}HX_3HX_{23/28}HX_4D$ 结构域, H 和 Ex 是铁离子的结合位点。应用 SOMPA 预测其二级结构, 分析结果表明该蛋白二级结构由 63.03% α -螺旋, 0.84% β -转角, 4.2%延伸, 以及 31.93%无规则卷曲所构成。

2.3 同源性比对构建进化树

将获得的双齿围沙蚕 *MP* 基因 cDNA 序列全长提交 GenBank (FJ212325), 并以 CLUSTAL W

```

5'-CCAACTGAGTTTAATCACTAACTTGAGAAAGCAATTTAACTTTGTGACTCGAGTTCAGCGCAGCTC
AGCACACCTTCAAG
82  ATGGGTTACGATATTCCTGAACCAATTCAAGTGGGACGAGTCCTTCAAGGCTTCTATGAC
    ■ G Y D I P E P F K W D E S F K V F Y D
142 ATGCTCGATGATGAGCACAAGCAGATCTTCAACGCCATCTTCGATGTCTGCGGTGGAAC
    ■ L D D E H K Q I F N A I F D V C G G N
202 AACGCTAACAACCTCAAGAAGATGATCGAAGTTACTGCCAACCACTTCAAGGATGAGGAG
    N A N N L K K ■ I E V T A N H F K D E E
262 GGCATGATGGTCTCTGCCAAGTATGCCGACTTCGACTCCCACAAGAAGAAGCAGAGGAC
    G ■ ■ V S A K Y A D F D S H K K K H E D
322 TTCTTGGCGTCATCCGTGGCCTCTCTGCTCCCGTCCCCGACGACAAGATCAAGTACGCC
    F L A V I R G L S A P V P D D K I K Y A
382 AAGGAATGGCTCGTCAACCACATCAAGGGAACCGACTTCCAGTACAAGGGCAAGTTGTAA
    K E W L V N H I K G T D F Q Y K G K L *
442 ACAGCGCGCCATGACGCAAAAGTGCCACCTAGCTGTTAGTGTGTTTCAGCGGGCGAGAGTGACGCT
CCTGGTGGTCAACAGCAAACTACGTGTCGTTGTGTGCAAAATGAATGACTGTCCCTGTTAGTCAGTTG
TCGTACCCCTACGACGCGTTTCTACACCTGGCAGCTTCGTGTTAATTCTCAGCCGATTAGTATTAAG
AACTTGCCAAGATTATGAGCAAACTACTCGCAGAAAACTCATCAAAATTCACGGACAGTTTCCTTA
AGATCAGACAAAATAAGATCATTATAAACAGGACCTTAACATCTGGTGTCTTTGTCACACTTAAGGTA
TTATTTCTCTCGTCAATCACATCCTAACATGCAATGTATATATTCTACATTGATTAATTTTGAATTT
GTGAATCTTGTGTGTTACATTTTAATAAACTCTGCTTTTCTAAAAA-3' 904
  
```

图 3 双齿围沙蚕 *MP II* cDNA 全长及推导的氨基酸序列

1-81 为 5' 非翻译区; 462-904 为 3' 非翻译区; 82-461 为核苷酸序列; 粗体字母为推导出的氨基酸序列; *为终止子。

Fig.3 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *Perinereis aibuhitensis* cDNA sequences of *MP II* gene (GenBank accession number: FJ212325)

5' untranslated regions are shown as 1-81, 3' untranslated regions are shown as 462-904 and the open reading frame is shown as 82-461. The deduced amino acid sequences are shown as bold letter, and the termination codon is indicated by an asterisk.

<i>Perinereis aibuhitensis</i> MP11 FJ212325	MGYDIPEPFKWNDESFKVFYDMLDDEHKQIFNAIFDVC GG-NNANNLKKMIEVTANHF KDE	59
<i>Nereis diversicolor</i> MP11 S 57799	MGFDIPEPFKWDASFVFKKLDEEHKAI FDSIFAVCNG-NNADNLKGMVDVTANHF SDE	59
<i>Periserrula leucophryna</i> Hr AY312845	-----QPYKWNDESQVFYEKLDEEHGKIFNAIFALCGG-NNADNLKSLVDVTANHF PADE	53
<i>Nereis diversicolor</i> MHR P22761	-GFEVPEPFKWNDESQVFYDKLDEEHKQIFNAIFALGGG-NNADNLKGMIDVTANHF ADE	58
<i>Hirudo medicinalis</i> Hr AY521548	MGFEIPEPYVWDESFVKVFYENLDEEHKGLFQAI FNLSKSPADNGALKHLSKVIDEHFSHE	60
<i>Theromyzon tessulatum</i> MHR AF279333	MVFEIPEPYQWDETFEVFYEKLDDEEHKGLFKGIKDLSDSPACSETLEKLVKLIEDHFTDE	60
<i>Lingula reevii</i> Hr P23544	-PFDIPEPYVWDESFVRYFDNLDEEHKGLFKGVFNCAADMSSAGNLKHLIDVTTTHFRNE	59
<i>Lingula anatina</i> Hr P22764	-GWEIPEPYVWDESFVRYFQDLDEEHKKIFKGI FDCIRDNS-APNLATLVKVTITNHF THE	58
<i>Lingula anatina</i> Hr P22765	-GFPVDPDFIWDASFKT FYDDLNDQHKQLFQAILTQG-NVGGATAGDNAYACLVHFLFE	58
<i>Phascolopsis gouldii</i> MHR P27686	-GFFIPDPYVWDESFVKVFYQLLDDKHKQIFQGVFDCAKDFSSAAKQLKLEIETAKHFSDE	59
<i>Phascolopsis gouldii</i> MHR P02244	MGFFIPDPYVWDFSRFTFYSIIDDEHKTLFNGIFHLAID-DNADNLGELRRCTGKHFLNE	59
<i>Themiste zostericola</i> MHR P02247	-GFFIPDPYQWDFSRFTFYSIIDDEHKTLFNGIFHLAID-DNADNLGELRRCTGKHFLNQ	58
<i>Themiste zostericola</i> MHR P 02245	-GFFIPDPYCWDISRFTFYITVDDEHKTLFNGILLLSQA-DNADHLNELRRCTGKHFLNE	58
<i>Themiste dyscriptum</i> MHR P02246	--MKVPAPYAWNSDFATTYENIDSEHRTL FNGLFALA-EFNTLTQLNAAIEVFTLHFHDE	57
<i>Siphonosoma cumanense</i> MHR P22766	--MKIPVPYAWTPDFKTTYENIDSEHRTL FNGLFALS-EFNTQHQQLNAAIEVFTLHFHDE	57
<i>Sipunculus nudus</i> MHR AJ632198	--VKVPEPFANWESFATSYKNIDLEHRTL FNGLFALS-EFNTRDQLLACKVEFVMHFRDE	57
	*: * * . * : * : * : * . :	
<i>Perinereis aibuhitensis</i> MP11 FJ212325	EGMMVS- AKYA-DFDSHKKKHEDFLAVIRGLSAPVDDKIKYAKEWLVNHIKGTDFQYKG	117
<i>Nereis diversicolor</i> MP11 S57799	EGMMKS- ANYA-DFDSHKKKHEDFLVIRGLSAPVDDKILHYAKDWLVNHIKGTDFQYKG	117
<i>Periserrula leucophryna</i> Hr AY312845	EAMMKASGSYG-DFDSHKKKH-----	73
<i>Nereis diversicolor</i> MHR P22761	EAMMLASAAKSEHPGHKKKHEDFLAVIRGLSAPVNDKLLYAKDWLVNHIKGTDFTYKG	118
<i>Hirudo medicinalis</i> Hr AY521548	EDMMKK- ASYS-DFDNHKKAHVDFQASLGGLSSPVANDKVHWAKDWLVNHIKGTDFLYKG	118
<i>Theromyzon tessulatum</i> MHR AF279333	EEMMKS- KSYE- DLDSHKKIHSDFVETLKGKAPVSEENIKMAKEWLVNHIKGTDFKYKG	118
<i>Lingula reevii</i> Hr P23544	EAMMDA- AKYE- NVVPHKQMHKDFLAKLGGLKAPLDQGTIDYAKDWLVQHIKTIIDFKYKG	117
<i>Lingula anatina</i> Hr P22764	EAMMDA- AKYS- EVVPHKQMHKDFLEKIGGLSAPVDAKQVNDYCKEWLVNHIKGTDFKYKG	116
<i>Lingula anatina</i> Hr P22765	EAMQV- AKYG- GYGAHKAHEEFLGKVKG-----GSADAAKYCDWLTQHIKTIIDFKYKG	111
<i>Phascolopsis gouldii</i> MHR P27686	ENMMQ- SKYS- GYPFHKKAHHEFLGKRLRPLDTAGLDYCKDWLVQHIKTIIDFKYKG	117
<i>Phascolopsis gouldii</i> MHR P02244	QVLMQA- SQYQ- FYDEHKKHEHETFIHALDN-----WKGDVVKWAKSWLVNHIKTIIDFKYKG	112
<i>Themiste zostericola</i> MHR P02247	EVLMA- SQYQ- FYDEHKKGAHEEFLIRALDN-----WKGDVVKWAKSWLVNHIKTIIDFKYKG	111
<i>Themiste zostericola</i> MHR P02245	QQLMQA- SQYA- GYAEHKKGAHDDFIHKLDT-----WDGDVVTYAKWLVNHIKTIIDFKYRG	111
<i>Themiste dyscriptum</i> MHR P02246	QGQMIR- SNYV- NTKEHTDIHNGFMDVMRGWRSFVPQQLLAGMAWLANHIPTEDFKYKG	115
<i>Siphonosoma cumanense</i> MHR P22766	QGQMIR- SNYV- NTKEHTDIHNGFMDVMRGWRSFVPQKALKDGMWLANHIPTEDFKYKG	115
<i>Sipunculus nudus</i> MHR AJ632198	QGQMEK- ANYE- HFEHHRGIEHGFLEKMGHWKAPVAQDKIFGMEWLVNHIPTEDFKYKG	115
	: * * * * *	

图 4 双齿围沙蚕 MP II 与其他动物相关蛋白比对结果

Hr 为血红蛋白, MHR 为肌血红蛋白。序列比对结果由 CLUSTAL W 1.83 软件分析获得。“*”为完全保守氨基酸;“.”为较相似氨基酸;“-”为相似氨基酸;粗体字母为与铁结合有关的残基;a, b, c, d 4 个小写字母下方的氨基酸序列为 α -螺旋区。

Fig. 4 Alignment of deduced protein sequences of MP II with selected amino acid sequences of marine invertebrate

Hr refers to hemerythrins, and MHR refers to myohemerythrins. The alignment was obtained using the Clustal W software. “*” donates conserved amino acids; “.” donates very similar amino acids; “-” donates similar amino acids. The bold letters are residues involved in iron binding. a, b, c, and d refer to the α -helices.

在线分析与其他物种相关序列进行比对, 如图 4。应用 BLAST 比对进行同源性分析, 结果表明, 所推导的氨基酸序列与环节动物多毛类 *P. Leucophryna* Hr(AY312845)、杂色沙蚕(*N. diversicolor*) MHR(P22761)、欧州医蛭(*Hirudo medicinalis*) Hr (AY 521548)、以及整嵌晶蛭(*Theromyzon tessulatum*) MHR(AF279333)分别具有 81.51%、77.12%、54.62% 和 43.86% 的同源性;与海豆芽属的 *Lingula reevii* Hr(P23544)、鸭嘴海豆芽(*Lingula anatina*) Hr (P22764, P22765)氨基酸的同源性分别为 38.60%、45.61% 和 40.87%;与仿革囊星虫属的 *Phascolopsis gouldii* MHR(P27686, P02244), 枝角星虫属的 *Themiste zostericola* MHR(P02247, P02245) 和 *Themiste dyscriptum* MHR(P02246), 以及库岛管体星虫(*Siphonosoma cumanense*) MHR(P22766)氨基酸序列同源性分别为 47.79%、57.76%、50.00%、

61.02%、44.64% 和 46.02%, 据此应用 NJ 法构建同源关系树(图 5)。由此推断该 cDNA 序列属于蚯蚓血红蛋白家族。

2.4 Cd²⁺暴露下 MP II mRNA 的表达情况

暴露于 40 mg/L Cd²⁺ 质量浓度下, 沙蚕于 12、24、48 和 72 h 后其体壁 MP II 基因表达变化如图 6。由图 6 可见, 在 Cd²⁺ 诱导后的 12~48 h, MP II mRNA 表达水平与空白对照组无明显差异, 分别为空白对照组的 0.91 和 0.77 倍;暴露 48 h 后, MP II mRNA 表达量有所升高, 约为空白对照组表达倍数的 2 倍;经 72 h 诱导后, MP II 基因表达量明显增加, 为对照组的 12.6 倍; Duncan 多重比较表明, 在 72 h 诱导后, MP II 基因表达水平与其他各时间均表现出极显著差异($P < 0.01$)。

图 7 表明, 暴露于 3 种质量浓度 Cd²⁺ 下 15 d 后, 随着 Cd²⁺ 浓度增大, 沙蚕 MP II mRNA 表达量

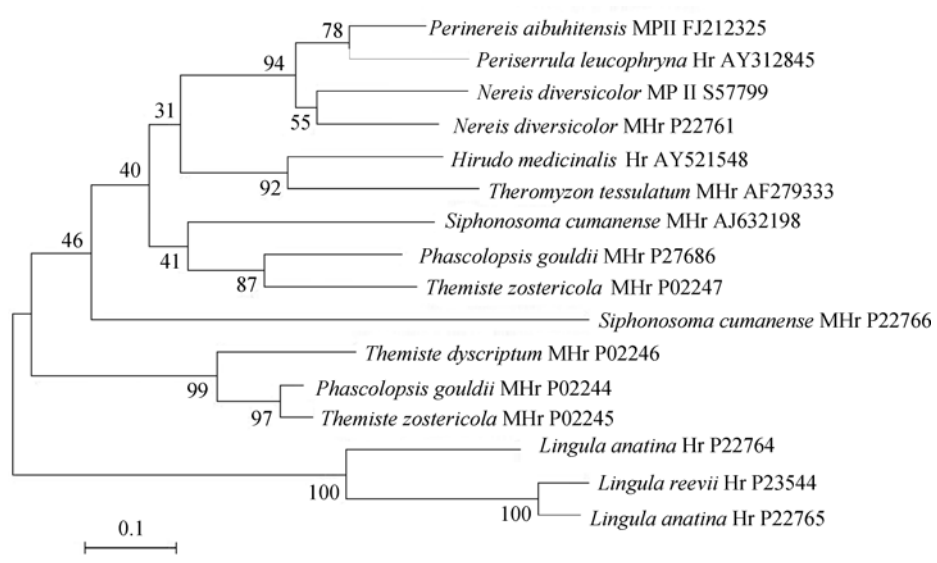


图 5 根据 MP II 蛋白氨基酸序列构建的同源关系树

Fig.5 Phylogenetic neighbour-joining tree based on the 119 amino acid sequences of MP II with the corresponding regions of 15 representative Hr and MHr from other species

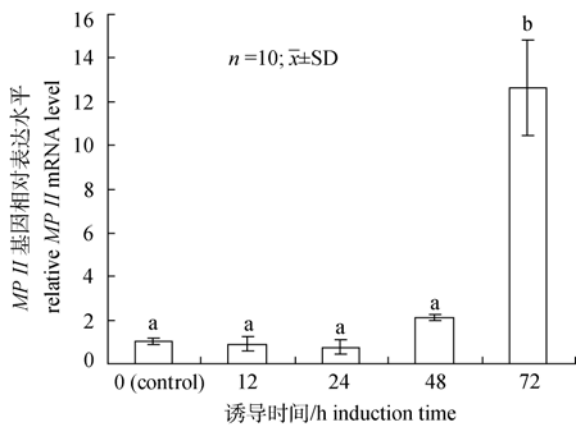


图 6 暴露于 40 mg/LCd²⁺质量浓度下沙蚕 *MP II* 基因在不同时间的表达量

标有不同字母的柱之间差异极显著($P < 0.01$).

Fig.6 Relative *MP II*mRNA levels in *Perinereis aibuhitensis* exposed to 40 mg/L Cd²⁺ for different time
Columns with different letters are extremely significantly different from each other($P < 0.01$).

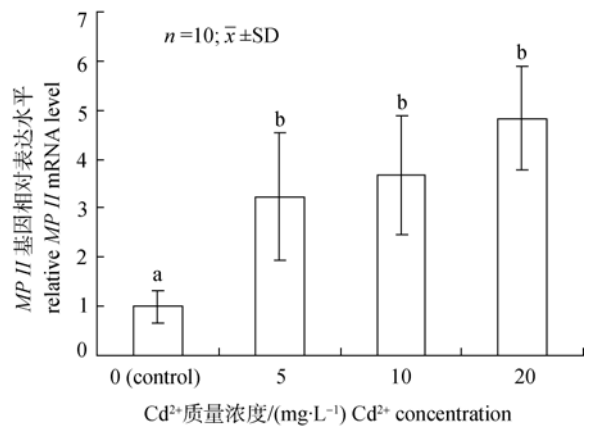


图 7 不同质量浓度 Cd²⁺诱导 15 d 后沙蚕 *MP II* 基因表达量的变化

标有不同字母的柱之间表示差异显著($P < 0.05$).

Fig.7 Relative *MP II*mRNA levels in *Perinereis aibuhitensis* exposed to different concentrations of Cd²⁺ after 15 days
Columns with different letters are significantly different from each other($P < 0.05$).

显著升高。3 种 Cd²⁺质量浓度(5、10 和 20 mg/L)下 *MP II*mRNA 表达量分别为对照组的 3.23、3.68、4.83 倍, 与对照组相比均呈现显著差异($P < 0.05$)。

3 讨论

重金属对基因表达的调控研究是近年环境、生态等领域研究的热点。已有许多研究证实, 动物耐受重金属的重要方式是形成特殊的金属硫蛋

白(metallothionein, MT), 与过量重金属络合从而达到解毒作用, 这对于研究动物重金属耐受性具有重要意义。与脊椎动物和大多数无脊椎动物不同, 在海洋多毛类中, 迄今尚未发现真正意义上的金属硫蛋白^[10-12]。虽然 Eriksen 等^[13]曾报道多毛类索沙蚕属 *Lumbrineris fragilis* 的镉结合蛋白具有某些金属硫蛋白的典型特征, 但其氨基酸组成、紫外吸收光谱和分子量上与金属硫蛋白截然

不同。Ruffin 等^[14]用 ^{35}S 标记半胱氨酸, 然后用二维电泳分离镉暴露后杂色沙蚕体内的蛋白质, 亦未检测到金属硫蛋白存在。Nejmeddine 等^[15]对 Cd^{2+} 暴露下杂色沙蚕的 MP 分离、纯化及特性研究表明, 组成 MP 的氨基酸中, 天冬氨酸(Asn)和谷氨酸(Glu)比例最高, 均为 13%; 其次是芳香族氨基酸(Phe、Trp、Tyr)、丙氨酸(Ala)、赖氨酸(Lys)和甘氨酸(Gly), 都为 10%; 酪氨酸(Tyr)和半胱氨酸(Cys)含量都最少, 分别为 3.5%和 0.9%。本研究由双齿围沙蚕 MP II cDNA 全长推导的氨基酸序列分析表明, 半胱氨酸(Cys)含量仅为 0.84%, 天冬氨酸(Asn)和谷氨酸(Glu)含量为 17.64%, 芳香族氨基酸含量(Phe、Trp、Tyr)为 13.44%, 组氨酸(His)含量为 4.2%, 这与以往对 MP II 蛋白的氨基酸分析结果相似。显然, 多毛类沙蚕 MP II 氨基酸组成是以半胱氨酸(Cys)含量极低, 且芳香族氨基酸丰富为特征的, 因而完全不同于金属硫蛋白^[15-16]。

Blast 比对显示本实验所获得的序列与多毛类、星虫、腕足类等海洋无脊椎动物的血红蛋白相似性最高。结构分析亦显示根据双齿围沙蚕 MP II cDNA 序列推导的蛋白含有血红蛋白家族的功能域, 其特征基序为 $\text{HX}_{29}\text{HX}_3\text{EX}_{16}\text{HX}_3\text{HX}_{23/28}\text{HX}_4\text{D}$ 结构域, 其中的组氨酸残基和谷氨酸残基是铁原子的结合位点, 并且组氨酸残基位点十分保守, 组氨酸残基位点分别为 25、54、73、77 和 111^[17], 属于血红蛋白超家族, 这从分子水平进一步证实了沙蚕 MP II 与血红蛋白家族的关系。

关于多毛类 MP II 的功能目前尚存在着不同假设。其中一种观点认为 MP II 不属于携氧蛋白, 其功能可能是作为结合体内过量必需或非必需游离重金属离子, 以保护蠕虫生理功能不受损害, 即在重金属暴露条件下, MP II 通过与进入体内的重金属结合而将 Fe 原子置换, 导致体内 Fe 原子代谢途径发生改变, 从而解除外来过量重金属离子的毒性作用^[18], 但其形成的调节机制尚不明确^[19]。本实验通过 Real time PCR 方法研究表明, 当沙蚕暴露于 40 mg/L 质量浓度 Cd^{2+} 72 h 后, MP II mRNA 表达量显著增加, 与对照组表现出

极显著差异($P<0.01$); 而在不同浓度 Cd^{2+} 诱导 15 d 后, 各暴露组 MP II mRNA 表达量较对照组均呈显著差异($P<0.05$); 多重比较虽未显示各暴露组之间的差异显著性, 但 3 种质量浓度 Cd^{2+} 暴露下 MP II mRNA 表达量分别为对照组的 3.2、3.7 和 4.8 倍, 表明随着 Cd^{2+} 浓度增大, 沙蚕 MP II mRNA 表达量还是显示了升高的趋势。上述结果一方面表明镉对 MP II 诱导表达应该是通过转录水平的调控机制实现; 另一方面, 亦证明在长期慢性重金属暴露条件下, 主要由 MP II 承担解毒作用^[20]。虽然 Demuyne 等^[20]应用 ELISA 方法检测到杂色沙蚕因暴露于 Cd^{2+} 导致消化道组织 MP II 水平有所增加, 但利用 Northern blotting 方法却未检测到 MP II mRNA 转录水平有任何显著变化, 从而认为该蛋白合成并非由 mRNA 转录所调控, 这与本研究结果有所不同。其原因可能是由于种类、取样部位, 以及基因表达定量方法存在差异所致。因此, 关于 MP II 基因表达调控发生在转录水平还是翻译水平, 亦或在两个水平均发生, 并存在其他因子参与调控其表达, 这些都有待进一步研究证实。

参考文献:

- [1] Gillet P, Mouloud M, Durou C, et al. Response of *Nereis diversicolor* population (Polychaeta, Nereididae) to the pollution impact-Authie and Seine estuaries (France) [J]. Estuar Coastal Shelf Sci, 2008, 76: 201-210.
- [2] Bryan G W, Hummerstone L G. Adaptation of the polychaete *Nereis diversicolor* to estuarine sediments containing high concentrations of zinc and cadmium [J]. Mar Biol Ass UK, 1973, 53: 839-857.
- [3] Suzuki K T, Yamamura M, Mori T. Cadmium-binding proteins induced in earthworm [J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1980, 9: 415-424.
- [4] Knutti R, Bucher P, Stengel M, et al. Cadmium in the invertebrate fauna of an unpolluted forest in Switzerland [J]. Environ Toxicol Ser, 1988, 2: 171-191.
- [5] Bryan G W, Johanson R. Heavy metal contamination in the sea in marine pollution [M]. Marine pollution, London: Academic Press, 1976: 185-302.
- [6] Cossa D, Lassus P. Le cadmium en milieu marin, biogéo-

- chimie et écotoxicologie [J]. Rapports scientifiques et techniques de l'IFREMER, 1989, 16: 111.
- [7] Nejmeddine A, Dhainaut-Courtiois N, BAERT J L, et al. Purification and characterization of a cadmium-binding protein from *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta) [J]. Comp Biochem Physiol C: Comp Pharmacol, 1988, 89: 321–326.
- [8] Dhainaut A, Raveillon B, M'Berri M, et al. Purification of an antibacterial protein in the coelomic fluid of *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta): similitude with a cadmium-binding protein [J]. Comp Biochem Physiol C: Comp Pharmacol, 1989, 94: 555–560.
- [9] 陈凤花, 王琳, 胡丽华. 实时荧光定量 RT-PCR 内参基因的选择[J]. 临床检验杂志, 2005, 23(5): 393–395.
- [10] Young J S, Roesijadi G. Reparatory adaptation to copper-induced injury and occurrence of a copper-binding protein in the polychaete *Eudisyla vanouvieri* [J]. Mar Pollut Bull, 1983, 14: 30–32.
- [11] Ritterhoff J, Zauke G P. Potential role of metal-binding proteins in cadmium detoxification in the mistolibellula (Mandt) and the misto abyssorum Boeck from the Green land Sea *Perinereis aibuhitensis* [J]. Mar Environ Res, 1998, 45(2): 179–191.
- [12] Roesijadi G. Behavior of metallothionein-bound metals in natural population of aneustuarine mollusc [J]. Mar Environ Res, 1994, 38: 147–168.
- [13] Eriksen D B, Nicole D C, Eliane P H. Translation in a ceil-free system, and in *Xenopus oocytes*, of mRNA which specify a cadmium-binding protein in *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta) [J]. Biol Cell, 1989, 67: 167–184.
- [14] Ruffin P, Denynck S, Hilbert J L, et al. Stress proteins in the polychaete annelid *Nereis diversicolor* induced by heat shock or cadmium exposure [J]. Biochimie, 1994, 76: 423–427.
- [15] Nejmeddine A. Biological effects of cadmium on a marine invertebrata (*Nereis diversicolor*): isolation and characterization of metalloproteine [J]. Agric Plant Vet Sci, 1987, 2: 111.
- [16] 茹炳根, 潘爱华, 黄秉乾, 等. 金属硫蛋白[J]. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(4): 245–259.
- [17] Stefano V, Enrico N, Xavier B, et al. Molecular evolution and phylogeny of *Sipunculan hemerythrins* [J]. Mol Evol, 2006, 62: 32–41.
- [18] Denuynck S, Sautiere P, van Beeumen J, et al. Homologies between hemerythrins of sipunculids and a cadmium-binding protein(MPII) from a polychaete annelid, *Nereis diversicolor* [J]. C R Acad Sci Paris, 1991, 312: 317–322.
- [19] 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 Pollut Bull, 2003, 46: 1450–1455.
- [20] Demuynck S, Dhainaut C N. Metal-protein binding patterns in the polychaete worm *Nereis diversicolor* during short-term acute cadmium stress [J]. Comp Biochem Physiol, 1994, 108C: 59–64.

Cloning and expression of the metalloprotein (MP II) gene from polychaetes *Perinereis aibuhitensis* (Annelida: Polychaeta)

YANG Dazuo¹, ZHOU Yibing¹, CHEN Xue¹, ZHOU Xiaoxiao¹, WANG Bin¹, YUAN Xiutang², SUN Jingbo³

1. Key Laboratory of Marine Bio-resources Restoration and Habitat Reparation in Liaoning Province, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China;

3. Takara Biotechnology (Dalian), Dalian 116600, China

Abstract: In the present study, the partial cDNA of metalloprotein II (MP II) was amplified from the total RNA of epidermis muscle of the polychaete, *Perinereis aibuhitensis*, by reverse transcription polymerase chain reaction with the primers designed based upon the homologous cDNA sequence of MP II from *Nereis diversicolor*. Other primers were designed according to the partial sequence of *Perinereis aibuhitensis* MP II and two fragments of approximately 600 bp and 250 bp were obtained using 3'- and 5'-RACE, and sequenced. Sequence analysis revealed a 904 bp cDNA containing an 81 bp 5'-untranslated region, 463 bp 3'-untranslated regions, and 357 bp open reading frame putatively encoding a protein of 119 amino acids. The deduced amino acid sequence of MP II was subjected to BLAST search for similarity with published sequences and it was found that MP II shared high identity (81.51%) with *Periserrula leucophryna* hemerythrin, also with myohemerythrin of *Nereis diversicolor* (77.12%), and with the hemerythrin of *Themiste zostericola* (61.02%). Furthermore, the deduced amino acid sequence of MP II contained the conserved motif (HX₂₉HX₃EX₁₆HX₃HX_{23/28}HX₄D) of the hemerythrin family of proteins, suggesting that MP II belongs to the hemerythrin family. The expression levels of *Perinereis aibuhitensis* MP II were detected after exposure to 40 mg/L Cd²⁺ for 12, 24, 48, and 72 h using quantitative PCR. The expression levels of MP II mRNA during 15 d were also detected under three concentrations of Cd²⁺. The current study showed that the expression levels of the MP II were approximately 12.6-fold higher ($P < 0.01$) than control group at 40 mg/L Cd²⁺ after 72 h. The level of MP II mRNA produced in the muscle tissue of sandworm increased significantly following exposure to Cd²⁺ of 5, 10, and 20 mg/L after 15 d, and were above 4.8-fold than control group ($P < 0.05$). Therefore, the expression level of the MP II increased with increasing concentrations of Cd²⁺. We suggest that heavy metal Cd²⁺ is associated with the induction of MP II expression, and the present study provided molecular support for the assessment of early ecological risks for monitoring the marine sediment environment based on the health of clamworm.

Key words: *Perinereis aibuhitensis*; MP II cDNA; RACE; Cd²⁺; quantitative PCR

Corresponding author: ZHOU Yibing. E-mail: ybzhou@dlou.edu.cn