

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00950

虾夷马粪海胆溶菌酶基因全长 cDNA 的克隆与表达分析

姬南京, 杨芸菲, 丁君, 常亚青

大连海洋大学 农业部北方海水增殖重点实验室, 辽宁 大连 116023

摘要: 本实验采用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术克隆得到了虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)溶菌酶(LYZ)基因的全长 cDNA 序列。结果表明, 虾夷马粪海胆 LYZ 基因全长为 912 bp, 含有 1 个 480 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 159 个氨基酸, 其中第 1–20 个氨基酸为信号肽, 蛋白计算分子量为 17.69 kD, 等电点为 7.75。氨基酸比对分析表明, 虾夷马粪海胆 LYZ 基因与紫球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)和刺参(*Apostichopus japonicus*)的 i 型 LYZ 基因相似百分比分别为 91.4% 和 59.3%, 并且含有 i 型 LYZ 基因的保守序列 DVGSLSCGP (Y)Y(F)QIK, 所以推断本实验克隆的溶菌酶为 i 型。采用实时定量 PCR 方法, 以 β -actin 为内标, 对其在虾夷马粪海胆各组织中的表达进行研究, 发现 LYZ 基因在围口膜中表达量最高, 其次是齿间肌、管足、肠、体腔液、雄性性腺和雌性性腺。利用脂多糖(LPS)刺激虾夷马粪海胆, 取刺激后不同时间的海胆体腔液, 对该基因的表达差异进行分析。结果表明, 虾夷马粪海胆的 LYZ 基因在 LPS 刺激后 8 h 时表达量最高, 12 h 时开始逐步回落, 至 36 h 时回落至对照组相近水平。本结果可为虾夷马粪海胆免疫学研究及抗病相关分子标记的开发提供参考依据。

关键词: 虾夷马粪海胆; 溶菌酶; 基因表达; 脂多糖(LPS)

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2013)05–0950–08

溶菌酶(lysozyme, LYZ, EC3.2.1.17)又称胞壁质酶, 是一种碱性球蛋白, 1921 年由 Fleming 首次发现, 它的主要作用是能够切断细菌细胞壁肽聚糖中 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间的 β -1,4 糖苷键, 从而破坏细胞壁, 引起细胞裂解^[1–2]。该酶按照其来源可分为 6 类: c 型溶菌酶, g 型溶菌酶, i 型溶菌酶, 植物溶菌酶, 细菌溶菌酶以及 T4 噬菌体溶菌酶^[3]。其中 c 型、g 型、i 型溶菌酶普遍存在于动物界, 它们不仅具有抗菌防御功能^[4–6], 在某些生物体内还具有消化功能^[7–9]。

1975 年 Jollès 等^[10]基于海星(*Asterias rubens*)溶菌酶 N-端序列与 c 型溶菌酶、g 型溶菌酶之间的差异, 首次提出了 i 型溶菌酶。此后菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、珠螺(*Lunella coronata*)、蚯蚓(*Eisenia fetida*)溶菌酶氨基酸序列的相

继获得, 才充分证明 i 型溶菌酶是无脊椎动物所特有的^[11]。i 型溶菌酶在无脊椎动物免疫及消化系统起重要作用, 一方面对革兰氏阳性菌及革兰氏阴性菌具有很强的抗菌活性^[12–13], 细菌刺激下, 基因表达水平提高^[14–15]; 另一方面在以细菌作为营养源的生物体消化系统中, 检测到较高的溶菌酶活性^[16]。2000 年 Zavalova 等^[17–18]在医用水蛭的失稳酶中发现了糖苷酶活力, 于是失稳酶被认定为 i 型溶菌酶, 因此 i 型溶菌酶还具有失稳酶活性, 破坏纤维蛋白 ϵ -(γ -Glu)-Lys 的交联键, 使纤维蛋白发生水解。

虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)又称中间球海胆, 隶属棘皮动物门、游走亚门、海胆纲、正形目、球海胆科, 是海洋中一类比较常见的无脊椎动物^[19]。虾夷马粪海胆原产于日本

收稿日期: 2012–12–07; 修订日期: 2013–03–15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30972269); 国家 863 计划项目(2012AA10A412); 辽宁省科技计划项目(2007203004).

作者简介: 姬南京(1988–), 男, 研究生, 主要从事海洋动物遗传育种研究. E-mail: jinnanjing@126.com.

通信作者: 常亚青(1967–), 教授. E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

北海道和俄罗斯远东的一些沿海地区, 1989 年由大连海洋大学引入中国^[20], 目前已成为中国主要的海水养殖品种之一。随着海胆养殖业的发展, 海胆也面临着多种病害的威胁, 如海胆的黑嘴病、红斑病、秃海胆病等细菌性疾病及海胆变形虫病等^[19], 因此研究其免疫相关基因在病原菌刺激下的表达模式尤为重要。本研究克隆测序了虾夷马粪海胆 *LYZ* 基因全长 cDNA, 观察并分析该基因在不同组织及 LPS 刺激后在体腔液中的表达情况。为虾夷马粪海胆免疫学基础研究提供参考依据, 也为抗病相关分子标记的开发、抗病品系的选育奠定基础。

1 实验材料与方法

1.1 材料

实验用 2 龄虾夷马粪海胆由大连海洋大学农业部北方海水增殖重点实验室培育。取 3 只健康虾夷马粪海胆的围口膜、齿间肌、肠、管足、雌性腺、雄性腺、体腔液。取 3 只健康海胆, 注射 100 μ L 的脂多糖(LPS, 0.1 mg/mL)溶液, 在注射后 4、8、12、24、32 h 分别抽取 3 只海胆的体腔液, 以健康海胆的体腔液为对照组。所有实验样品液氮冷冻后于-80℃保存。

1.2 总 RNA 的提取与反转录

采用 RNeasy pure Tissue Kit(北京天根)按推荐方法提取虾夷马粪海胆各个样品的总 RNA。1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 核酸定量仪(AB, UK)检测 RNA 的浓度, -80℃保存备用。使用 M-MLV 反转录酶(TaKaRa)按推荐方法合成 cDNA 第一链, 反转录体系: 虾夷马粪海胆总 RNA 100 ng, 1 μ L Oligo(dT)₁₈, 5 $\times$ M-MLV Buffer 2 μ L, dNTP(10mmol/L) 0.5 μ L, RNase 抑制剂 0.25 μ L, 用 RNase-free 补足至 10 μ L。反应条件: 42℃水浴 60 min, 70℃保温 15 min, 冰上冷却。

1.3 *LYZ* 基因 cDNA 核心片段序列的克隆

根据 GenBank 中紫球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*, XM_783250)和刺参(*Apostichopus japonicus*, EF036468)*LYZ* 基因保守序列设计 1 对基因特异性引物 LYZ-F 和 LYZ-R(表 1), 以上述第 1

链 cDNA 稀释 10 倍为模板, PCR 扩增虾夷马粪海胆 *LYZ* 基因的核心片段。50 μ L 反应体系中包含: cDNA 模板 2 μ L、10 μ mol/L 的上下游引物各 2 μ L、10 $\times$ Ex Tap Buffer(Mg²⁺Plus)5 μ L、dNTP Mixture (2.5 mmol/L)4 μ L、Ex DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.25 μ L, 去离子水补充至 50 μ L。PCR 反应条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃ 40 s, 55℃ 40 s, 72℃ 50 s, 共 35 个循环; 72℃ 10 min。1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测, 切取目的条带, 胶回收采用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工); 然后将回收的 PCR 产物与 pMD 19-T(TaKaRa)载体连接, 转化感受态细胞 DH5 α , 37℃培养, 挑白斑在含青霉素的 LB 液体培养基中扩大培养, 取 1 μ L 培养的菌液为模板, 用 LYZ-F 和 LYZ-R 为引物进行 PCR 验证, 送上海生工生物工程技术有限公司进行正反向测序。

表 1 用于 *LYZ* 基因 cDNA RT-PCR、RACR 和定量 PCR 的引物序列

Tab.1 Primers used for <i>LYZ</i> gene cDNA RT-PCR, RACE and real-time PCR	
引物 primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')
LYZ-F	GGYTCTCTRTCGTGTGGT
LYZ-R	ATTTGGWCCGCCGTTGTG
LYZ ₃ -F ₁	CCATACCAGATAAAGGAC
LYZ ₃ -F ₂	ACGCTGTCTTCAGTCGCC
LYZ ₅ -R ₁	TCCCCGCCTTTCATCCTG
LYZ ₅ -R ₂	GTTCCAGTAATCGTCCTT
3'-CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ VN
5'-CDS	(T) ₂₅ VN
UMP	Long: CTAATACGACTCACTATAGGGC AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT Short: CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT
q-LYZ-F	GGAGACGGTACAGGGCTACA
q-LYZ-R	CGGGCAAAATCCTCACAAAG
q-Actin-F	AGAGGCGTAGAGGGAAAGAC
q-Actin-R	ACAGGGAAAAGATGGCACAGA

1.4 *LYZ* 基因 3' RACE 和 5' RACE

根据得到的核心片段设计 3' RACE (Rapid amplification of cDNA ends, RACE)和 5' RACE 特异性引物 LYZ₃-F₁、LYZ₃-F₂、LYZ₅-R₁ 和 LYZ₅-R₂

(表 1)。采用 SMARTer™ RACE cDNA 扩增试剂盒(TaKaRa)进行 3' RACE 和 5' RACE 克隆。10 μ L 反转录体系中含: 100 ng RNA、2 μ L 5 $\times$ First-strand Buffer、1 μ L DTT(20 mmol/L)、1 μ L dNTP(10 mmol/L)、0.25 μ L RNase 抑制剂、1 μ L Superscript II 逆转录酶(100 U/ μ L)、1 μ L 5'-CDS 或 3'-CDS 引物, 用 RNase-free 水补至 10 μ L, 另外 5' RACE cDNA 合成时需再加 1 μ L SMART II Oligo 引物。反应条件: 42℃ 水浴 90 min, 70℃ 保温 10 min, 冰上冷却。5' RACE PCR 扩增以 5' RACE cDNA 为模板, UMP 和 LYZ₅-R₁ 为引物进行第 1 轮 PCR 扩增, 第 1 轮扩增产物稀释 10 倍后, 用 NUP 与 LYZ₅-R₂ 进行第 2 轮 PCR 扩增。3' RACE PCR 扩增以 3' RACE cDNA 为模板, UMP 和 LYZ₃-F₁ 为引物进行第 1 轮 PCR 扩增, 第 1 轮扩增产物稀释 10 倍后, 用 NUP 与 LYZ₃-F₂ 进行第 2 轮 PCR 扩增, 上述两个 PCR 反应体系和条件同核心序列扩增。1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 切取目的条带并回收, 克隆测序, 方法同核心序列克隆。

1.5 序列分析

用 DNASTar 中的 SeqMan 软件对正反序列进行组装, 分别得到 LYZ 基因 cDNA 核心序列、3' 端序列和 5' 端序列, 最后用 SeqMan 软件将 3 段序列组装成完整的全长 cDNA 序列。用 EditSeq 对得到的序列进行分析, 寻找开放阅读框(ORF), 翻译成氨基酸序列。通过 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 分析信号肽及切割位点, 利用 <http://www.predictprotein.org/> 对编码蛋白质的二级结构进行预测, 采用 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)进行三级结构的预测。从 GenBank 下载不同类型的溶菌酶序列与本研究获得的虾夷马粪海胆氨基酸序列进行 Clust W 比对, 然后用 MEGA4.0^[21] 采用邻接(Neighbour-Joining, NJ)法(Amion:p-distance model, 1000 replicates, bootstrap phylogeny test)构建基于 LYZ 氨基酸序列的分子系统发育树。

1.6 LYZ 基因实时定量表达分析

为了比较 LYZ 基因在不同组织以及 LPS 处理

组与未处理组之间表达差异。采用 PrimeScript® RT reagent Kit(TaKaRa)按推荐方法合成各个样品 cDNA 第一链, 10 μ L 反转录体系中含: 总 RNA 400 ng、5 $\times$ PrimeScript® Buffer 2 μ L、PrimeScript® RT Enzyme Mix I 0.5 μ L、25 pmol Oligo(dT) Primer、50 pmol Random 6 mers, 最后补水至 10 μ L。反转录条件为: 37℃ 水浴 15 min, 85℃ 保温 5 s 灭活反转录酶。以 β -actin 为内参基因, 利用 ABI-STEPONE 荧光定量 PCR 仪(ABI, USA), SYBR® Premix Ex Taq™ II Kit(TaKaRa)进行实时定量 PCR。20 μ L 反应体系中含: 2 $\times$ SYBR® Premix Ex Taq™ II 10 μ L, 正反向引物各 0.8 μ L (10 μ mol/L), ROX Reference Dye II 0.4 μ L, 模板 cDNA 2 μ L, 去离子水 6 μ L。反应条件: 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 共 40 个循环; 反应前 94℃ 30 s; 反应后进行熔解曲线分析, 以排除非特异性扩增的污染。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 LYZ 基因的相对表达量^[22], 基因表达水平以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)来表示, 并用 SPSS13.0 统计软件对数据进行显著性分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 虾夷马粪海胆 LYZ 基因全长 cDNA 序列分析

将核心片段与 RACE 获得的 cDNA 序列进行拼接后, 得到 912 bp 全长 cDNA 序列, 并提交 GenBank(登录号: JN936415), 其全序列与推测的氨基酸序列见图 1。该 cDNA 含有 1 个 480 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 159 个氨基酸, 5' 端非编码区 263 bp, 3' 端非编码区 169 bp, 编码氨基酸的计算分子量为 17.69 kD, 理论等电点为 7.75。信号肽预测表明, N-端的前 20 个氨基酸构成信号肽。139 个氨基酸的成熟肽中含有 10 个 Cys 残基, 计算分子量为 15.65 kD, 理论等电点为 7.79。该氨基酸可能的功能位点包括: 1 个 N-糖基化位点, Asn¹³⁵; 1 个磷酸腺苷和环磷酸鸟苷依赖性蛋白激酶磷酸化位点, Arg⁸⁸; 两个蛋白酶 C 磷酸化位点, Ser⁸⁶ 和 Thr¹³⁹; 2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, Ser¹¹² 和 Thr¹¹⁹; 2 个 N-豆蔻酰化位点, Gly⁵⁹ 和 Gly¹²⁹; 1 个酰胺化位点, Asn¹⁵¹。

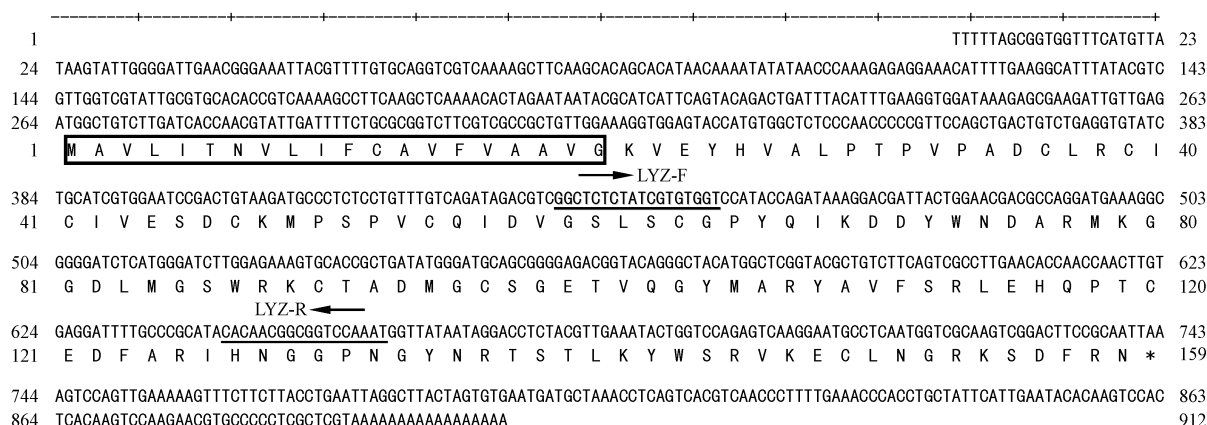


图 1 虾夷马粪海胆 *LYZ* 基因全长 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

*代表终止密码子, 单下划线碱基代表 RT-PCR 引物, 加框氨基酸为信号肽. 该核苷酸序列已提交 GenBank, 登录号 JN936415.

Fig. 1 The full cDNA and deduced amino acid sequence of *Strongylocentrotus intermedius* LYZ gene

An asterisk represents a termination codon. The underlined bases indicated the primers used for RT-PCR. The boxed amino acid sequence indicated signal peptide. The nucleotide sequence has been submitted to GenBank with accession no. JN936415.

2.2 LYZ 空间模拟结构预测

采用 SWISS-MODEL 软件同源建模的方法, 将 LYZ 蛋白序列与软件搜索的模板(PD code: 2dqaB)日本缀绵蛤(*Tapes japonica*)进行匹配, LYZ 蛋白序列中第 28-156 个氨基酸序列构建了其三维结构, 其三维结构中包括 5 个 α -螺旋及 3 个 β 片层, 如图 2 所示。

2.3 LYZ 基因编码氨基酸序列的同源性比较和聚类分析

虾夷马粪海胆 *LYZ* 氨基酸序列与紫球海胆、刺参、海星和医用水蛭的 i 型溶菌酶的相似百分比分别为 91.4%、59.3%、57.4%和 38.1%，且该序列具有 i 型溶菌酶的一段特有的氨基酸保守序列 *DVGLS*CGP(Y)Y(F)QIK(图 3)。基于虾夷马粪海胆和其他动物 *LYZ* 基因编码氨基酸序列构建了系统发育树(图 4)。其拓扑结构显示，虾夷马粪海胆 *LYZ* 与 i 型 *LYZ* 聚为独立一枝，自展支持率为 100%，c 型溶菌酶与 g 型溶菌酶也分别聚成独立一枝，其中 c 型溶菌酶与 i 型溶菌酶聚为一大枝。

2.4 虾夷马粪海胆 *LYZ* 基因的组织表达

利用实时定量 PCR 方法对 *LYZ* 基因在虾夷马粪海胆围口膜、齿间肌、肠、管足、雌性腺、雄性腺、体腔液 7 种组织中的表达进行了研究。结果显示 *LYZ* 基因在 7 种组织中均有表达, 其中 *LYZ* 基因在围口膜的表达量显著高于其他组织 ($P <$

0.05), 肠和体腔液之间的表达量无统计学差异, 雄性生殖腺和雌性生殖腺表达量相对较低(图 5)。

2.5 LPS 刺激不同时间对虾夷马粪海胆体腔液中 LYZ 基因表达量的影响

应用实时定量 PCR 方法研究了 LPS 刺激不同时间对虾夷马粪海胆体腔液中 *LYZ* 基因表达量的影响。如图 6 所示, 与未刺激的对照组相比, 在刺激后 4 h 时, 虾夷马粪海胆的溶菌酶基因表达量开始表现出明显的上升趋势, 并在 8 h 时升至最高值, 为对照组的 4.7 倍($P<0.05$), 然后从 12 h 时起开始逐步回落, 在 36 h 时回落至与对照组相近, 4、8、12、24 h 的表达量与对照组相比均差异显著($P<0.05$)。

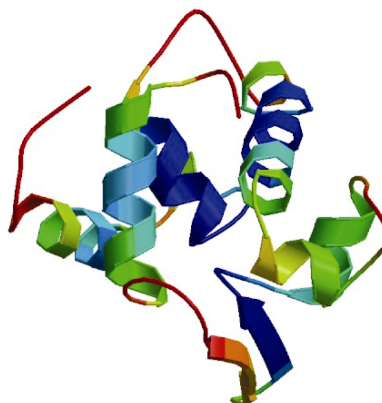


图2 虾夷马粪海胆溶菌酶(LYZ)空间结构预测

Fig.2 The predicted three-dimensional structure of *Strongylocentrotus intermedius* lysozyme (LYZ)

虾夷马粪海胆 <i>S. intermedius</i>	MAVLITNVLI FCAVFVAAGVKVEYHVALPTVPADCLRCICIVESDCKMPSPVCGIDVGSLSGPGYQIKDDYWNDARMKG	80
刺参 <i>A. japonicus</i>	. I-----PQITRS. LLLLIVM. ASGQ. . S. . K. . F. . T. TI. . L. HM. LG. . Q. . L. .	70
海星 <i>A. rubens</i>	. IG. --HL. V. . STVAF. MLGNVPS. TSSG. . SG. V. . G. R. . N. . RM. KG. . S. . TL. .	78
紫球海胆 <i>S. Purpuratus</i>	. . . V. L. TEK. K. K. AH. . HM.	80
医用水蛭 <i>H. medicinalis</i>	. I-----IA. Y-----VSLALLIAS. EVNSQFTDS. K. . G-. DSQIGK. GM. KP. . I. CGKP.	69

虾夷马粪海胆 <i>S. intermedius</i>	GDLMGSRKCTADMGCSETVQGYMARYAVFSRLEHQPTCEDFARIHNGGPNGYNRTSTLKYWSRVKECLNGRKSDFRN	159
刺参 <i>A. japonicus</i>	. S. D. D. Q. . S. TFD. . ERA. TYA. N. FKNPA. E. . . L. . K. . --DM. --N.	145
海星 <i>A. rubens</i>	. S. . . D. K. . . . TSP. . EAA. E. QG. . G. P. KNPA. FG. . LK. . A. . MANET--KI	155
紫球海胆 <i>S. Purpuratus</i>	 S. K.	151
医用水蛭 <i>H. medicinalis</i>	----. GYES. . KNKA. . ETC. RA. . K. . GT. CTGGRT. . Q. Y. R. CKSSA. VG. . NK. QK. . R	136

图 3 虾夷马粪海胆与刺参、海星、紫球海胆和医用水蛭 LYZ 基因编码氨基酸序列比对

GenBank 登录号分别为: 虾夷马粪海胆(AEW10548); 刺参(ABK34500); 海星(AAR29291); 紫球海胆(XP_788343); 医用水蛭(AAA96144). 与顶行的虾夷马粪海胆氨基酸序列相比, 相同的用“.”表示, 比对间隙用“-”表示. *表示 i 型 LYZ 一段特有的氨基酸保守序列.

Fig.3 Alingment of the LYZ gene deduced amino acid sequence from *Strongylocentrotus intermedius* with the corresponding sequence from *Apostichopus japonicus*, *A. rubens*, *S. purpuratus* and *Hirudo medicinalis*

GenBank accession no.: *S. intermedius*, AEW10548; *A. japonicus*, ABK34500; *A.rubens*, AAR29291; *S. purpuratus* XP_788343; *H.medicinalis*, AAA96144. Sites with an amino acid identical to that on the top line (*S. intermedius*) indicated with a dot. Alignment gaps are indicated by dashes. The conservative sequences in all i-type lysozyme are indicated by *.

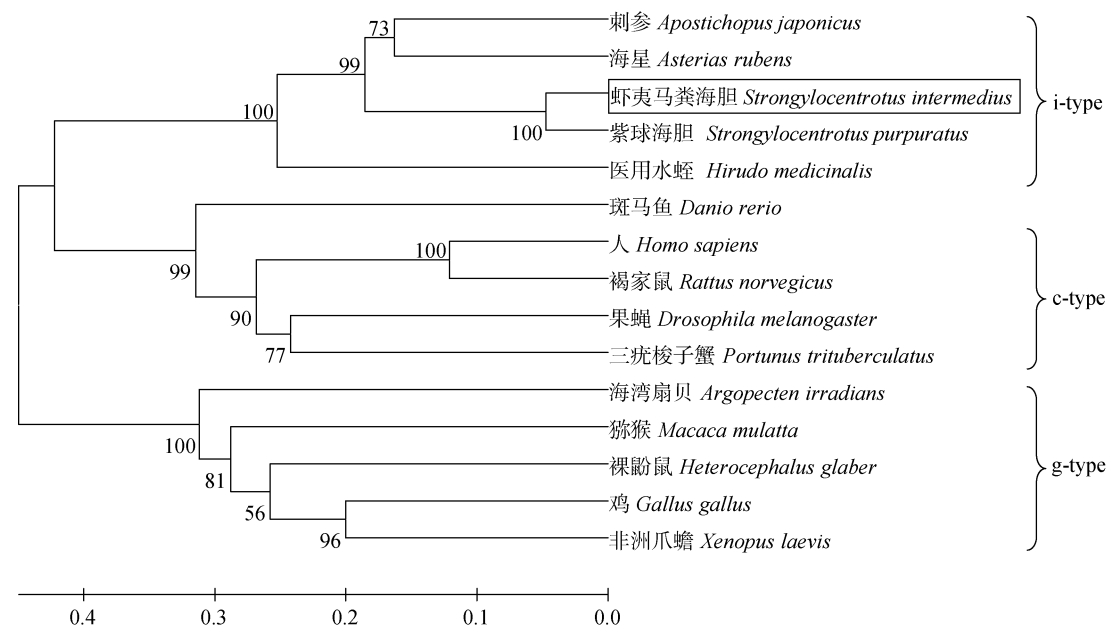


图 4 采用 NJ 法基于溶菌酶氨基酸序列构建系统发育树

距离矩阵使用 Amino:P-distance 模型计算, 分支上自展支持率通过 1 000 次重复获得的. GenBank 登录号分别为: 刺参, ABK34500; 海星, AAR29291; 虾夷马粪海胆, AEW10548, 加框是本研究所得序列; 紫球海胆, XP_788343; 医用水蛭, AAA96144; 斑马鱼, AAI62644; 人, NP_000230; 褐家鼠, NP_036903; 果蝇, ABK57077; 三疣梭子蟹, ACM24796; 海湾扇贝, AAX09979; 猕猴, NP_001181190; 裸鼯鼠, EHB10589; 鸡, NP_001001470; 非洲爪蟾, NP_001088153.

Fig.4 Phylogenetic tree based on lysozyme amino acid sequence by NJ method

The distance matrix was calculated using the Amino: P-distance model, the tree topology was evaluated by 1 000 replication bootstraps. The numbers on each branch of the tree represent the bootstrap support value. GenBank accession numbers: *A. japonicus*, ABK34500; *A. rubens*, AAR29291; *S. intermedius*, AEW10548, which was boxed to show present study; *S. purpuratus*, XP_788343; *H. medicinalis*, AAA96144; *Danio rerio*, AAI62644; *Homo sapiens*, NP_000230; *Rattus norvegicus*, NP_036903; *Drosophila melanogaster*, ABK57077; *Portunus trituberculatus*, ACM24796; *Argopecten irradians*, AAX09979; *Macaca mulatta*, NP_001181190; *Heterocephalus glaber*, EHB10589; *Gallus gallus*, NP_001001470; *Xenopus laevis*, NP_001088153.

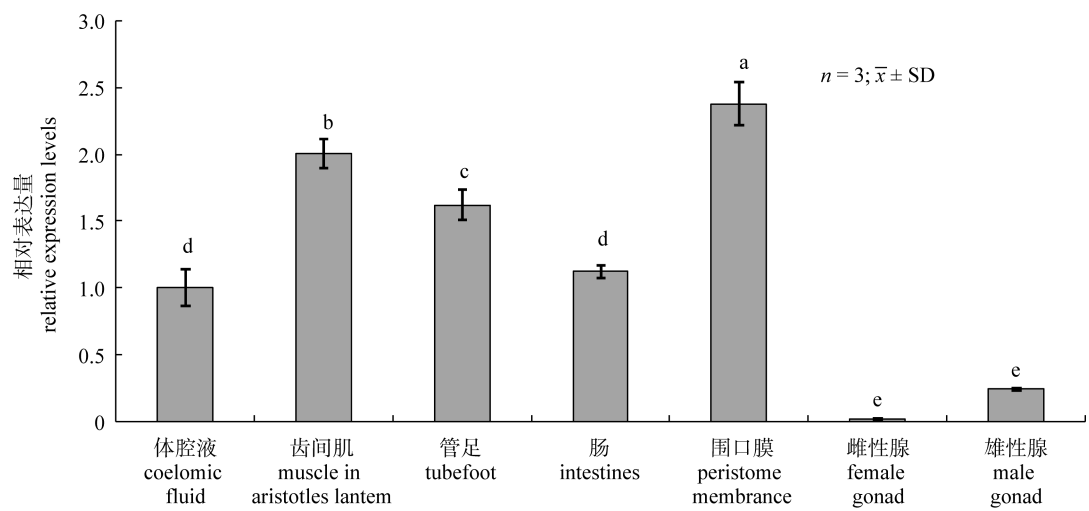


图 5 *LYZ* 在虾夷马粪海胆各组织中的表达水平
上标字母不同表示差异显著($P<0.05$).
Fig. 5 Expression of *LYZ* mRNA in different tissues of *Strongylocentrotus intermedius*
The different letters show significant differences($P<0.05$).

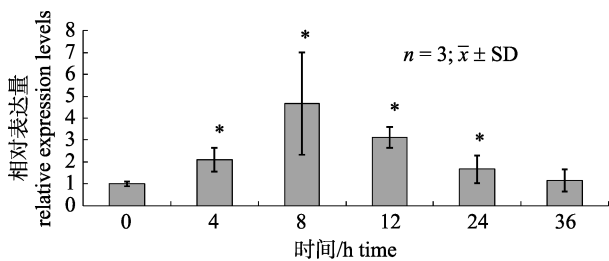


图 6 虾夷马粪海胆 *LYZ* 基因在 LPS 刺激下在体腔液中的表达情况
*表示与对照组相比显著差异($P<0.05$).
Fig. 6 Expression of *LYZ* gene in coelomic fluid in *Strongylocentrotus intermedius* after LPS challenge
Significant differences with control were indicated with an asterisk($P<0.05$).

3 讨论

本研究采取设计兼并引物的方法克服同源克隆的困难。对于 3'RACE 和 5'RACE, 本研究根据试剂盒推荐方法, 设计巢式 PCR 引物提高扩增的特异性, 以避免非特异性扩增。虾夷马粪海胆 *LYZ* 基因全长 912 bp, 含有 1 个 480 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 159 个氨基酸。将虾夷马粪海胆 *LYZ* 氨基酸序列和其他动物 *LYZ* 氨基酸序列进行聚类分析, 结果表明本研究得到的 *LYZ* 基因与 i 型溶菌酶聚为独立一枝。Clust W 序列比对结果表明, 该序列具有 i 型溶菌酶的一段特有的氨基酸保守序列 DVGSLSCGP(Y)Y(F)QIK^[23], 所以推断

本研究克隆的虾夷马粪海胆 *LYZ* 基因为 i 型。另外在 *LYZ* 的成熟肽中含有 10 个半胱氨酸残基, 这一现象在 i 型溶菌酶中普遍存在^[24-26], 其主要为了形成二硫键, 以维持蛋白质在高渗透压海水环境及消化器官中的稳定性^[11]。动物界中的 3 种溶菌酶虽然在一级结构上差异较大, 但它们的三级结构却极为相似, 本研究中, 根据得到的氨基酸序列构建的 *LYZ* 三维结构与日本缀锦蛤(*Tapes japonica*) *LYZ* 的三级结构极为相似。

LYZ 基因在虾夷马粪海胆各组织的定量表达分析显示, 溶菌酶在围口膜、齿间肌和管足中表达量显著高于其他组织($P<0.05$)。海胆以围口膜面附着在底质或海带、裙带菜等大型藻的表面, 通过口器中的齿间肌控制牙齿进行食物摄取、食物磨碎, 而管足是棘皮动物辐管系统的主要组成部分之一, 具有吸附、感觉、摄食及辅助运动等功能^[19], 因此围口膜、齿间肌和管足这 3 个组织最易受到外界病原菌的刺激, 而 *LYZ* 基因的高度表达, 可以形成生物体抵御病原菌的第一道防线。*LYZ* 基因在肠组织和体腔液中的表达量差异不显著($P<0.05$), 其中肠作为海胆消化系统的主要组成部分, 是食物消化和吸收的主要场所, 而体腔液中有许多免疫细胞, 因此 *LYZ* 可同时作用于消化系统和免疫系统。另外 *LYZ* 基因在雌、雄性腺

中的表达无显著差异,且表达量显著低于其他组织($P<0.05$)。

无脊椎动物的免疫机制属于先天性免疫,即机体对各种外来入侵物的反应没有特异性。棘皮动物有宽阔的真体腔,在体腔中有体腔液,体腔液类似于脊椎动物的淋巴,在体腔液中含有参加免疫反应的细胞。体腔细胞在海胆防御系统中起着至关重要的作用,其同多种体液免疫因子,如凝集素、溶血素和调理素等共同参与免疫应答,并直接作用于入侵病原体^[27]。Coteur 等^[28]和 Holm 等^[29]研究发现,海星(*Asterias rubens*)体腔注射细菌刺激后,均表现为体腔细胞增多。Kaneshiro 等^[30]对海星(*Dermasterias imbricate*)体腔注射细菌进行刺激后,发现体腔细胞增多的同时,LYZ 参与细菌的清除。Ovando 等^[31]研究发现,海胆(*Sterechinus neumayeri*)体腔注射病原菌后,体腔细胞总数与对照组相比显著增加($P<0.05$),免疫相关基因 *Sn-AIF-1* 表达量显著升高。本研究发现,LPS 处理组海胆体腔液中 LYZ 基因表达量快速升高,8 h 达到最大值,36 h 后回落至对照组水平。说明虾夷马粪海胆溶菌酶参与机体的免疫反应,可以较为快速抵御外界病原的侵害。

对于无脊椎动物,溶菌酶在免疫和消化系统中都起到非常重要的作用。本研究首次对虾夷马粪海胆 LYZ 基因的一系列表达模式进行了初步研究,为后续海胆抗病相关分子标记开发及抗病品系选育等方面打下基础。

参考文献:

- [1] Salton M R J. The properties of lysozyme and its action on microorganisms[J]. Bacteriol Rev, 1957, 21(2): 82–100.
- [2] Chipman D M, Sharon N. Mechanism of lysozyme action[J]. Science, 1969, 165(892): 454–465.
- [3] Callewaert L, Michiels C W. Lysozymes in the animal kingdom[J]. J Biosci, 2010, 35(1): 127–160.
- [4] Masschalck B, Michiels C W. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria[J]. Critic Rev Microbiol 2003, 29(3): 191–214.
- [5] Düring K, Porsch P, Mahn A, et al. The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes[J]. Febs Lett, 1999, 449(2): 93–100.
- [6] Baskova I P, Zavalova L L. Polyfunctionality of lysozyme destabilase from the medicinal leech[J]. Russ J Bioorg Chem, 2008, 34(3): 304–309.
- [7] Kornegay J R, Schilling J W, Wilson A C. Molecular adaptation of a leaf-eating bird: stomach lysozyme of the hoatzin[J]. Mol Biol Evol, 1994, 11(6): 921–928.
- [8] Dobson D E, Prager E M, Wilson A C. Stomach lysozymes of ruminant I distribution and catalytic properties [J]. J Biol Chem, 1984, 259: 11607–11616.
- [9] Xue Q G, Itoh N, Schey K L, et al. A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes[J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(1): 82–95.
- [10] Jollès J, Jollès P. The lysozyme from *Asterias rubens*[J]. Eur J Biochem, 2008, 54(1): 19–23.
- [11] Ito Y, Yoshikawa A, Hotani T, et al. Amino acid sequences of lysozymes newly purified from invertebrates imply wide distribution of a novel class in the lysozyme family[J]. Eur J Biochem, 2001, 259(1–2): 456–461.
- [12] Nilsen I W, Øverbø K, Sandsdalen E, et al. Protein purification and gene isolation of chlamsyn, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity[J]. Febs Lett, 1999, 464(3): 153–158.
- [13] Cong L, Yang X, Wang X, et al. Characterization of an i-type lysozyme gene from the sea cucumber *Stichopus japonicus*, and enzymatic and nonenzymatic antimicrobial activities of its recombinant protein[J]. J Biosci Bioeng, 2009, 107(6): 583–588.
- [14] Zhao J, Qiu L, Ning X, et al. Cloning and characterization of an invertebrate type lysozyme from *Venerupis philippinarum* [J]. Comp Biochem Physiol, 2010, 156(1)B: 56–60.
- [15] Li H, Parisi M-G, Toubiana M, et al. Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses[J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 25(1): 143–152.
- [16] McHenry J G, Birkbeck T H. Lysozyme of the mussel, *Mytilus edulis* (L.)[J]. Mar Biol Lett, 1979, 1: 111–119.
- [17] Zavalova L L, Baskova I P, Lukyanov S A, et al. Destabilase from the medicinal leech is a representative of a novel family of lysozymes[J]. BBA-Protein Struct M, 2000, 1478(1): 69–77.
- [18] Zavalova L, Lukyanov S, Baskova I, et al. Genes from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) coding for unusual enzymes that specifically cleave endo-ε (γ-Glu)-Lys isopeptide bonds and help to dissolve blood clots[J]. Mol Gene Genet, 1996, 253(1): 20–25.
- [19] 常亚青, 丁君, 宋坚, 等. 海参, 海胆生物学研究与养殖 [M]. 北京: 海洋出版社, 2004: 199–202.
- [20] 王子臣, 常亚青. 虾夷马粪海胆人工育苗的研究[J]. 中国

- 水产科学, 1997, 4(1): 60–67.
- [21] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [23] Bachali S, Jager M, Hassanin A, et al. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function[J]. *J Mol Evol*, 2002, 54(5): 652–664.
- [24] Itoh N, Xue Q, Li Y, et al. cDNA cloning and tissue expression of plasma lysozyme in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(5): 957–968.
- [25] Itoh N, Takahashi K G. cDNA cloning and *in situ* hybridization of a novel lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Comp Biochem Physiol*, 2007, 148(2)B: 160–166.
- [26] Matsumoto T, Nakamura A M, Takahashi K G. Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2006, 145(3)B: 325–330.
- [27] 孟繁伊, 麦康森, 马洪明, 等. 棘皮动物免疫学研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36(7): 803–809.
- [28] Coteur G, DeBecker G, Warnau M, et al. Differentiation of immune cells challenged by bacteria in the common European starfish, *Asterias rubens* (Echinodermata)[J]. *Eur J Cell Biol*, 2002, 81(7): 413–418.
- [29] Holm K, Dupont S, Sköld H, et al. Induced cell proliferation in putative haematopoietic tissues of the sea star, *Asterias rubens* (L.)[J]. *J Exp Biol*, 2008, 211(16): 2551–2558.
- [30] Kaneshiro E S, Karp R D. The ultrastructure of coelomocytes of the sea star *Dermasterias imbricata*[J]. *Biol Bull*, 1980, 159(2): 295–310.
- [31] Ovando F, Gimpel C, Cardenas C, et al. Cloning and expression analysis of allograft inflammatory factor type 1 in coelomocytes of antarctic sea urchin (*Sterechinus neumayeri*) [J]. *J Shellfish Res*, 2012, 31(3): 875–883.

Cloning and expression analysis of a sea urchin(*Strongylocentrotus intermedius*) lysozyme gene

Ji Nanjing, YANG Yunfei, DING Jun, CHANG Yaqing

Dalian Ocean University, Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China Sea, Ministry of Agriculture, Dalian 116023, China

Abstract: A full-length cDNA coding lysozyme (LYZ) was cloned from sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends(RACE) methods. The full-length cDNA of LYZ was 912 bp with a 480 bp open reading frame(ORF) encoding 159 amino acids, which included a signal peptide of 20 amino acids at the N-terminus and a mature peptide of 139 amino acids. The deduced amino acid sequence had a putative size of 17.69 kD and the theoretical isoelectric point was 7.75. The multiple alignments revealed identity of 91.4% between *S. intermedius* and *S. purpuratus* and 59.3% identity between *S. intermedius* and *Apostichopus japonicus* in the i-type LYZ amino acid sequence. The i-type lysozyme conserved sequence DVGSLSCGP(Y)Y(F)QIK was detected in the *S. intermedius* amino acid sequence. These results indicate that the cDNA sequence cloned from *S. intermedius* is a member of the i-type lysozyme family. Real-time quantitative PCR was carried out to measure LYZ mRNA expression in different tissues and monitor LYZ mRNA expression patterns in the coelomic fluid after a lipopolysaccharide (LPS) challenge. LYZ mRNA expression levels in peristome membrane were significantly higher than those of muscle in the Aristotle's lantern, tube-foot, intestines, coelomic fluid, male gonad, and female gonad ($P<0.05$). LYZ expression in the coelomic fluid was up-regulated after the LPS challenge and reached its maximum level at 8 h post-stimulation, and decreased gradually thereafter. Thirty-six hours after the LPS challenge, LYZ levels in the coelomic fluid were similar to those of the control.

Key words: *Strongylocentrotus intermedius*; lysozyme; gene expression; lipopolysaccharide(LPS)

Corresponding author: CHANG Yaqing. E-mail: yqchang@dlou.edu.cn