

# 海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 金属硫蛋白 基因的克隆与分析\*

刘维青 倪多娇 宋林生<sup>1)</sup> 吴龙涛 胥炜 孔晓瑜

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室 青岛

266071; 中国海洋大学水产学院 青岛 266003)

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室 青岛 266071)

(中国海洋大学水产学院 青岛 266003)

**提要** 金属硫蛋白是一种普遍存在于生物体内的低分子量、半胱氨酸含量丰富、易于被外界刺激诱导的金属结合蛋白。采用表达序列标签法,结合 cDNA 末端快速扩增技术,首次获得了海湾扇贝金属硫蛋白 (AMT) 的全长 cDNA 序列。该序列全长 787bp, 5'UTR (Untranslated Region) 为 79bp, 3'UTR 为 270bp, 开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 长度为 438bp, 可编码 145 个氨基酸。在其编码的氨基酸序列中半胱氨酸含量丰富, 甘氨酸含量也较高, 芳香族氨基酸含量低, 不含组氨酸, 存在有无脊椎动物和软体动物金属硫蛋白的特征序列 CKCXXX-CXCX, C-末端的氨基酸序列也符合软体动物金属硫蛋白标签序列 C-x-C-x(3)-C-T-G-x(3)-C-x-C-x(3)-C-x-C-K。序列特征分析表明, 该序列具备金属硫蛋白的典型特征, 是金属硫蛋白家族的成员。

**关键词** 海湾扇贝, 金属硫蛋白基因, EST, cDNA 文库

**中图分类号** Q78

金属硫蛋白 (Metallothionein, MT) 是一类广泛存在于生物体内、能被金属离子、氧化损伤以及免疫刺激等多种因素诱导产生的金属结合蛋白。金属硫蛋白具有很强的金属结合能力和氧化还原能力, 在生物体内参与细胞内金属水平的稳态调节、自由基清除、重金属解毒等, 具有重要的生物学功能。虽然 MT 具有多样化的生物学功能, 但是普遍认为, 它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调节和非必需金属元素的解毒 (Coyle et al, 2002)。在通常情况下, Zn、Cu 和 Cd 是最常见 MT 结合金属。MT 对 Zn 和 Cu 具有强亲和力, 能与它们结合从而充当它们的储存蛋白。体外实验表明, Zn-MT 和 Cu-MT 对许多酶类和蛋白质具有激活作用。对贝类的研究表明, MT 在细胞内

Cd 的解毒中具有重要作用 (Bebianno et al, 1992, 1998; Chabirovsky et al, 2003)。陆生蜗牛之所以能忍受高浓度的 Cd 和 Cu 并在它们的软体组织中大量积累这两种重金属, 与其中肠腺 MT 的 Cd 解毒功能以及外套膜 MT 的 Cu 调节功能是分不开的 (Dallinger et al, 1997)。另外, 对非必需重金属, 如 Hg, Ag, Pb, Sn, Ga, Bi 和 Au 等, MT 也能与之结合并将其排出体外从而达到解毒的作用 (Butler et al, 2000)。生物体内 MT 表达水平受环境中重金属特别是 Cd 诱导会显著增加, 所以 MT 作为监测环境重金属污染状况的生物指标日益受到人们的重视。

20 世纪 70 年代首次报道了海洋无脊椎动物——美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 的 MT (Ridlington et al, 1979)。20 多年来, 在无脊椎动

\* 863 国家高技术研究发展计划资助项目, 2002AA626020 号; 国家自然科学基金资助项目, 40276045 号。刘维青, 硕士研究生, E-mail: weiwetop@hotmail.com

1) 通讯作者: 宋林生, 研究员, E-mail: lshsong@msqdin.ac.cn

收稿日期: 2005-02-07 收修改稿日期: 2005-09-21

物 MT 结构研究上取得了很大进展, 至今已发现大多数无脊椎动物种中都存在 MT (Roesijadi *et al.* 1991; Lemoine *et al.* 2003; Rebelo *et al.* 2003)。目前海洋贝类金属硫蛋白基因研究主要集中在贻贝和牡蛎, 而扇贝金属硫蛋白基因的研究较少。海湾扇贝是引自美国的海水养殖贝类, 在我国海水养殖业中发挥着重要作用。本研究中作者利用分子生物学手段克隆并分析海湾扇贝金属硫蛋白基因全长 cDNA 序列, 以期为金属硫蛋白家族的进化研究, 结构与功能的解析, 扇贝金属硫蛋白参与体内必需金属元素的调节和非必需金属元素的解毒的机制研究提供基础, 同时研究海湾扇贝金属硫蛋白也对在生产实践上应用金属硫蛋白作为生物标志物, 监测养殖海域的重金属污染具有重要的参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验用海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) [购自青岛市南山市场, 体重为 (25±2) g] 在室内暂养 10 天后在闭壳肌中注射 50 $\mu$ l 鳃弧菌 (*Listonella anguillarum*) ( $OD_{600} = 0.4$ ), 12h 后, 利用液氮浸泡扇贝全组织并研磨, 之后加入 Trizol (Invetrogen 公司) 提取海湾扇贝的总 RNA, 按照 ZAP-cDNA 合成和 ZAP-cDNA GigaPack III GoH cbing kit 说明手册 (Stratagene 公司) 进行 cDNA 合成和文库构建。对所构建的海湾扇贝 cDNA 文库随机挑取阳性克隆进行大规模测序, 所得序列经过 NCBI 数据库中的载体数据库屏蔽掉所得序列中的载体序列后进行序列拼接。用 BLAST 程序分别将获得的拼接序列 (contigs) 和单一 EST 序列 (singleton) 与 GenBank 中的数据进行比对。

### 1.2 海湾扇贝金属硫蛋白基因全长 cDNA 的克隆和序列测定

序列比对发现在海湾扇贝的 EST 数据库中存在一条序列与其他无脊椎动物的金属硫蛋白有很高的同源性。根据这条 EST 序列, 用 primer premier 5.0 设计出分别与 DNA 3' 和 5' 末端对应的特异性引物 AMTE: 5'-GTTGTTCTGTCTAGGCGAC-3' 和 AMTR: 5'-AACTCTACACAACCTGAGT-3'。用 pBluescript SK (+/-) 载体上的通用引物 T7 和 T3 与设计的基因特异性引物对海湾扇贝的 cDNA 文库进行扩增, 得到海湾扇贝金属硫蛋白基因的 3' 末端及 5' 末端。扩增 3' 末端的 PCR 反应参数: 首先 94 $^{\circ}$ C, 5m in, 然后 32 个循环

为 94 $^{\circ}$ C, 45s, 56 $^{\circ}$ C, 30s, 72 $^{\circ}$ C, 1m in, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10m in, 扩增 5' 末端的 PCR 反应参数: 94 $^{\circ}$ C, 5m in, 94 $^{\circ}$ C, 45s, 50 $^{\circ}$ C, 30s, 72 $^{\circ}$ C, 50s, 共 32 个循环, 然后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10m in, 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分离检测, 从凝胶中回收 PCR 产物, 连入克隆载体 pMD18-T, 转化大肠杆菌 XL1-blue 菌株, 用所获得的阳性克隆进行序列测定。

### 1.3 海湾扇贝金属硫蛋白氨基酸序列的同源性分析及分子进化分析

将获得的海湾扇贝金属硫蛋白编码基因的全长 cDNA 序列与 GenBank 核酸数据库及蛋白质数据库作 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 分析。同时将 cDNA 序列推导成氨基酸序列, 确定正确的开放阅读框 (Open Reading Frame ORF), 用 BLASTp, ClustalW 对蛋白作序列比对及同源性分析。将海湾扇贝金属硫蛋白氨基酸序列和其他物种的金属硫蛋白的氨基酸序列用 ClustalW 比对, 然后用 PHYLIP 软件绘制金属硫蛋白的分子系统树。

## 2 结果

### 2.1 海湾扇贝金属硫蛋白编码基因 cDNA 全长序列的特征

图 1 为拼接后海湾扇贝金属硫蛋白编码基因的 cDNA 全长及推导的氨基酸序列。获得的 cDNA 序列全长 787bp, 5' UTR 为 79bp, 3' UTR 为 270bp, 开放阅读框长度为 438bp, 可以编码 145 个氨基酸。图 1 中 AATAAA 为推测的多聚腺苷酸加尾信号位点 (Polyadenylation Signal Site)。

### 2.2 海湾扇贝金属硫蛋白氨基酸的序列特征

拼接后的序列经 BLASTX 分析, 与其他双壳类的金属硫蛋白表现出较高的相似性。其中与美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 的金属硫蛋白相似性最高 (相似性在 40% 以上,  $E$  值在  $2E-13$  至  $2E-10$  之间)。与贻贝 (*Mytilus edulis*) 金属硫蛋白 MT-20H1 (GenBank Accession No. CAA06553.1) 相似性为 50%,  $E$  值为  $1E-13$ 。

在推导的氨基酸序列中共有 40 个 Cys 残基, 它们与邻近的氨基酸组成了若干个金属硫蛋白的保守性结构 Cys-X<sub>n</sub>-Cys。预测的分子量为 14.28kD, 理论等电点为 8.23, 为碱性蛋白。Cys 含量 27.6%, Gly 含量 13.1%, Phe 含量仅为 2.1%, 不含组氨酸。使用 ClustalW 工具将得到的海湾扇贝 MT 氨基酸序列与其他四种软体动物金属硫蛋白氨基酸序列进行多序列比较, 可以看

```

1                                     GAATTCGGCACGAGGCTAT
20 ATTAGTCATGCACGGCCGGTGCAGAAAGTTGTTCTGTTCTAGCCGACATATCCAGCTGTG
80 ATGTCTTCCGAAGCCGTTTTCTGTGCCAAGTGTCTGGGGGCAAATGTGGCTGTGCTGGT
1 M S S E A V F C A K C P G G K C G C A G
140 CCTGACTGCTGTACCTCCGCGTGAGATGTTCCGGGTGTAAGGTCAACTGCGCATGCTTC
21 P D C C T S A C R C S G C K V N C A C F
200 TCTGCCAAGTCTTCTACCTGCCCTGATGGCGTCTGCCAGATGGGCGTGGCCTGCAAGTGC
41 S A K S S T C P D G V C Q M G V A C K C
260 GGAGTTTCTGTAAGTGCAGCGACTCCTGCCCGTGTCCAAACTGCAAGGCCGGATGTA
61 G G S C K C S D S C P C P N C K A G C K
320 TGTGCAGGTGCAAACCTTCGTGTGCTCCGATGATTGCCAGTCTGGAAAGTCTGCGGAACC
81 C A G A N F V C S D D C Q S G K C C G T
380 AGTGATTGCAAGTGTGATGGTCAGTGGCATGTCCAAAGTGAAGTGAATTGTGCATCT
101 S D C K C D G Q C A C P K C K C N C A S
440 GGAACCTGCACATGTGGCGTAGGTTGCACTGGACCTAACTCGTGAAGTGTGGCACTGAC
121 G T C T C G V G C T G P N S C K C G T D
500 TGCAAGTGTAAAGCAATGAGTGATGACGTCATCGGGAATCTACTACAACAATCAATCGACG
141 C K C K Q *
560 TTTCTGCTGATACTCAGTTGTGTGTAGAGTTTAAAGTACTCATTTTTTATCACGTCCTGT
620 TATCTAAAGAACACTTAATCGACATAAAATAAACAAAGTGTGGTGTGCTTTGTAGTAT
680 TTAATGTAGTTATCAATGCATTGTTGCTGTAAAGCTGTTTTCTTCTTCGAGAAATAAAAT
740 AAATATAACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 海湾扇贝金属硫蛋白编码基因 cDNA 全长及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence of MT cDNA from *A. irradians* and its deduced amino acid sequence

注:方框标出的是多聚腺苷酸加尾信号位点 AATAAA;下划线标出的是特异性引物在序列中的位置。

斜体标出的是符合无脊椎动物 MT 的特征序列,阴影标出的是符合软体动物 MT 的标签序列

出海湾扇贝金属硫蛋白与其他四种软体动物金属硫蛋白在 Cys 的排列方式上显示出较高的保守性(图 2)。

将海湾扇贝金属硫蛋白的氨基酸序列与来自其他 13 个物种的金属硫蛋白氨基酸序列以 ClustalW 比对后,利用 PHYLIP 软件,以邻位相接(NJ)法,构建了金属硫蛋白的系统树(图 3)。进化树采用 bootstrap 检验。在该进化树中软体动物形成一大独立的分支,其中海湾扇贝与蜗牛聚成一支与其他软体动物聚成的分支合并在一起,并且与果蝇距离较近,与鱼类及哺乳动物相距较远。海湾扇贝金属硫蛋白的分子进化地位与海湾扇贝的生物学分类地位基本一致。

### 3 讨论

本研究中采用表达序列标签法,结合 RACE 末端快速扩增技术,获得了海湾扇贝金属硫蛋白

的全长 cDNA 序列。海湾扇贝 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 27.6%,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 13.1%,这也是软体动物 MT 特征之一(Engelken *et al.* 1999)。脊椎动物 MT 一般不含芳香族氨基酸,但某些种类的无脊椎动物 MT 含有少量芳香族氨基酸(牛长缨等, 2002)。海湾扇贝 MT 中就含有 2.1% 的 Phe 但没有 Trp 和 Tyr。与其他无脊椎动物的 MT 一样,海湾扇贝 MT 富含 Cys-X(1-3)-Cys 结构,其中 8 个 Cys-X-Cys 结构,6 个 Cys-X-X-Cys 结构,5 个 Cys-X-X-X-Cys 结构,还有 2 个 Cys-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,最常见的结合金属是 Zn、Cu 和 Cd 等重金属。无脊椎动物和软

AiMT	MSSEAVFCAKCPGGKCGCAGPDCCTSACRCSGCKVNCACFSAKSSTCPDG	50
MeMT	MPAP---CNCIESNVICIG-----TGCSGEG-----	23
MgMT	MPGP---CNCIETNVICIG-----TGCSGKC-----	23
CvMT	MSDP---CNCIETGTACAS-----DSCPATG-----	23
HpMT	MS-----GKGKGEKC-----TSACRSE-----	17
AiMT	VCQMGVACKCGGSCKCSDS-CPNCKAGCKCAGANFVCSDDCQSGKCCG	99
MeMT	-----CRCGDAKCKSGADCKCSGCKV-----	44
MgMT	-----CQCGDAKCKCASG-CGCSGCKV-----	43
CvMT	-----CKCGPGCKCGDD-CKCAGCKV-----	43
HpMT	-----PCQCGSKCKCGEG-CTCAACKT-----	38
AiMT	TSDCKCDGQCACPKCKCNCAS-GTCTCGVGCTGPNSCKCGTDCKCKKQ	145
MeMT	-----VCKCS--GSCACEAGCTGPNSTCRCAPGCSCK--	73
MgMT	-----VCRCS--GTCAAGCDCTGPNCKCESGCSCK--	72
CvMT	-----KCSCTSEGGCKCGEKCTGPATCKCGSGCSCKK	75
HpMT	-----CNCITS-DGCKCGKECTGPDSCKCGSSCSCK--	67

图 2 海湾扇贝与其他几种软体动物金属硫蛋白氨基酸的多序列比对结果

Fig. 2 A lignent of an ino acid sequences ofA MT andMT s of other molhsc animals

方框表示保守的 Cys的位置, 阴影部分表示无脊椎动物和软体动物金属硫蛋白的特征序列。图中所用 MT 序列在 GenBank 中的注册号为: M aMT, 贻贝 (*Mytilus edulis*), CAA06551. 1; M gMT, 贻贝 (*M. galloprovincialis*), P69154; CMT, 美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*), AAQ23907. 1; HpMT, 蜗牛 (*Helix pomatia*), AAK84863. 1; AiMT, 海湾扇贝 (*A. irradians*)

体动物金属硫蛋白有一保守特征是 CKCXXXCX-CX特征序列 (Inagawa et al, 1990), 在海湾扇贝 MT 中有两段序列符合此模式 (图 1), 但在其他相关软体动物中只有一段 (图 2)。软体动物金属硫蛋白 C-末端有一个保守的特征序列 G-x-C-x(3)-C-T-G-x(3)-C-x-C-x(3)-C-x-C-K (Binz et al, 1999), 海湾扇贝 MT 序列 C-端的 CCGvgCTG-pnsCkCgtDckCK 完全符合这一特征序列。但并不是所有软体动物金属硫蛋白 C-末端序列都完全符合这一特征, 如美洲牡蛎 *Crassostrea virginica* 的 CvMT II D(AAQ23912. 1) 以及长牡蛎 *C. gigas* 的 CgMT (CAB85588. 1)。在根据金属硫蛋白氨基酸序列构建的系统树中, 各软体动物金属硫蛋白聚类的 Bootstrap 支持并不高, 这与软体动物金属硫蛋白的多样性有关。所以对软体动物 MT 的序列应当有更全面的特征描述以及合理的分类系统, 而这依赖于更多的软体动物 MT 序列的获得。

MT 的一个显著特点是其基因的转录能被环境金属诱导, 转录水平与环境金属浓度直接相

关。在正常生理状态下, 生物体内存在一定水平的 MT 以调节必需金属元素, 当周围环境中生物体内的金属含量达到一定的浓度时, 能诱导合成新的 MT。水生无脊椎动物 MT 含量能间接反映环境中的金属浓度。因此, 20 世纪 70 年代末就有人提出水生生物 MT 可作为一种指示水环境污染和毒性效应早期警报的主要生物标志, 以及水生环境自然种群金属污染压力评价和监测的分子生态毒理学诊断指标 (徐立红等, 1995; Bayne, 1979)。长期以来, MT 作为一种良好的生物标志, 对于水环境金属浓度的监测具有重要参考价值。

对 MT 的监测可以在多个水平进行, 如 MT 中金含量的增加、MT 蛋白的增加和相应 mRNA 的增加都可以作为指标 (徐立红等, 1995)。前两个指标都是间接检测 MT 的诱导作用, 以 mRNA 为指标则是在转录水平直接检测 MT 的诱导。后一种方法需要获得金属硫蛋白的 cDNA 序列。

海湾扇贝是我国 1982 年从美国引进的优良海水养殖品种 (张福绥等, 1986), 并于 1991 年再

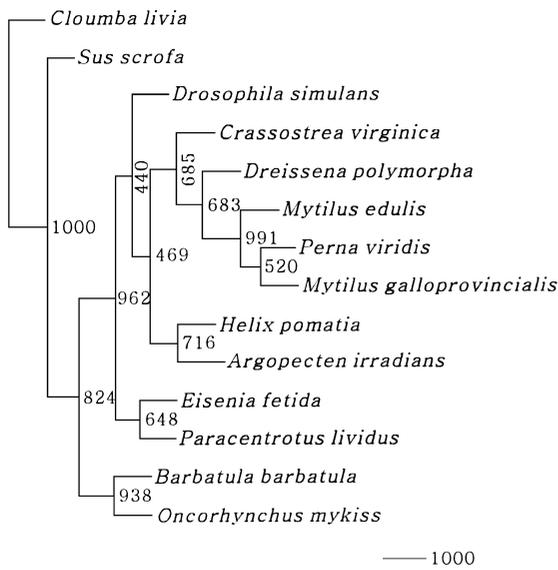


图 3 根据金属硫蛋白氨基酸序列使用邻接法构建出的系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree constructed by the amino acid sequences of A MT and other MTs

*Argopecten irradians*: 海湾扇贝; *Drosophila simulans*: 果蝇 (B61194); *Eisenia fetida*: 蚯蚓 (CAA15423.1); *Paracentrotus lividus*: 海胆 (CAC37693.1); *Columba livia*: 鸽 (P15786); *Mytilus edulis*: 贻贝 (CAA06551.1); *Mytilus galloprovincialis*: 贻贝 (P69154); *Perna viridis*: 翡翠贻贝 (AAF22486.1); *Dreissena polymorpha*: 斑纹贝 (AA B07548.1); *Sus scrofa*: 野猪 (BAA19178.1); *Oncohyndus mykiss*: 虹鳟 (AAA49564.1); *Barbatula barbatula*: 中华花鳅 (S38335); *Crassostrea virginica*: 美洲牡蛎 (AAQ23907.1); *Helix pomatia*: 蜗牛 (AAK 84863.1)

次引进复壮(张福绥等, 1997), 成为我国海洋贝类的主要养殖品种之一。尽管我国的海洋贝类养殖规模在过去的几十年中达到一定水平, 养殖总产量也居国际领先地位, 但近年来我国养殖扇贝的病害问题一直困扰着该产业的健康和可持续发展。引起扇贝死亡的原因是多方面的, 涉及病原、环境和扇贝生物本身等。重金属是目前海水中最主要的污染物之一, 严重影响海洋贝类的正常生长(张少娜等, 2004), 詹文毅等(2003)研究发现海水及生物体内重金属严重超标是造成江苏如东文蛤大面积死亡的主要原因。对重金属污染进行快速有效的监测, 对重金属污染的生态毒理效应进行评估, 并凭此对水质进行及时控制管理和保护是实现海洋生态环境保护和海水养殖业健康可持续发展的有力保证。本研究中克隆获得了海湾扇贝金属硫蛋白 cDNA 的全长序

列, 为在实践中以海湾扇贝 MT 的 mRNA 为指标监测水环境中金属污染状况提供了可能, 同时也对深入研究重金属污染对海湾扇贝生态毒理效应具有一定的参考价值。

## 参 考 文 献

- 牛长缨, 姜勇, 雷朝亮等, 2002 无脊椎动物金属硫蛋白的研究. 动物学杂志, 37(1): 72—75
- 张少娜, 孙耀, 宋云利等, 2004 紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 对 4 种重金属的生物富集动力学特性研究. 海洋与湖沼, 35(5): 438—445
- 张福绥, 何义朝, 马江虎, 1986 海湾扇贝引种、育苗及试养. 海洋与湖沼, 17(5): 367—374
- 张福绥, 何义朝, 亓欣欣等, 1997 海湾扇贝引种复壮的研究. 海洋与湖沼, 28(2): 146—152
- 徐立红, 张甬元, 陈宜瑜, 1995 分子生态毒理学研究进展及其在水环境保护中的意义. 水生生物学报, 19(2): 171—185
- 詹文毅, 王南平, 叶辉等, 2003 江苏如东文蛤大面积死亡原因探究. 海洋水产研究, 24(4): 62—65
- Bayne B L, 1979. Physiological measurements of stress. Reports et Procès-verbaux des Réunions 179: 56—61
- Bebiano M J, Langston W J, 1992 Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis*. Comparative Biochemistry and Physiology, 103C: 79—85
- Bebiano M J, Serafin M A, 1998 Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. The Science of the Total Environment 214: 123—131
- Binz P A, Kagi J H R, 1999 Metallothionein: Molecular Evolution and Classification. In: Klaassen C. ed. Metallothionein, Vol. IV. Birkhäuser Basel: 7—13
- Butler R A, Roesijad G, 2000 Metallothionein (MT) gene expression and cadmium-induced immunotoxicity in hemocytes of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Marine Environmental Research 50: 470
- Chabicozsky M, Niedeister H, Thaler R et al, 2003 Localization and quantification of Cd- and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. Toxicology and Applied Pharmacology, 190(1): 25—36
- Coyle P, Philcox J C, 2002 Metallothionein: The multipurpose protein. Cellular and Molecular Life Sciences 59: 627—647
- Dallinger R, Berger B, Hunziker P E et al, 1997. Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. Nature, 388: 237—238
- Engelken J H, Ildebrandt A, 1999. cDNA cloning and cadmi-

um-induced expression of metallothionein mRNA in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Biochemistry and Cell Biology, 77: 237—241

Inagawa M, Onozawa T, Okumura K *et al* 1990 Characterization of metallothionein cDNAs induced by cadmium in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Biochemical Journal 268: 237—240

Lemoine S, Laulier M, 2003 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 Marine Pollution Bulletin, 46 (11): 1450—1455

Rebelo M, Pfeiffer W, Silva H *et al* 2003 Cloning and detection of metallothionein mRNA by RT-PCR in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*). Aquatic Toxicology 64 (3): 359—362

Ridlington JW, Fowler B A, 1979. Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from the American oyster (*Crassostrea virginica*). Chemical-Biological Interactions May 25 (2—3): 127—138

Roesijadi G, Fowler B A, 1991. Purification of invertebrate metallothioneins Methods in Enzymology 205: 263—273

## CLONING AND CHARACTERIZATION OF A METALLOTHIONEIN GENE IN BAY SCALLOP *ARGOPECTEN IRRADIANS*

LU Wei-Qing, NI Duo-Jiao, SONG Li-Sheng, WU Long-Tao,  
XU Wei, KONG Xiao-Yu

(Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences Qingdao 266071;  
College of Fisheries Ocean University of China, Qingdao 266003)

(Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences  
Qingdao 266071)

(College of Fisheries Ocean University of China, Qingdao, 266003)

**Abstract** Metallothioneins (MTs) are low molecular weight cysteine-rich, inducible metal-binding proteins found in a variety of organisms. MTs have many important biological functions acted as a protective role against excess reactive heavy metal ions, free radical scavengers and reservoir of essential metals that can be donated to other metalloproteins. A partial sequence of the bay scallop *Argopecten irradians* metallothionein (named as A MT) gene was identified from *A. irradians* cDNA library using expressed sequence tag method. A pair of gene-specific primers was designed according to this sequence and the full-length of A MT cDNA was obtained using rapid amplification of cDNA end technique. The full-length cDNA of A MT was of 787 bp including a 5' untranslated region (UTR) of 79 bp, a 3' UTR of 270 bp and an open reading frame (ORF) of 438 bp encoding a polypeptide of 145 amino acids. The predicted amino acid sequence of A MT contained 40 cysteine residues organized in Cys-X<sub>(n)</sub>-Cys (n=1—3) motif as classically described for MTs. The contents of cysteine, glycine and phenylalanine in the A MT amino acids sequence were 27.6%, 13.1% and 2.1% respectively while no histidine residue was found. The CKCXXXCXCX motif, a conserved feature for invertebrate and molluscan MT, was found in two regions of the A MT. A specific pattern of mollusca MT C-x-C-x(3)-C-T-G-x(3)-C-x-C-x(3)-C-x-C-K located at the C-terminal. The result of sequence analysis indicated that A MT was the member of metallothionein family.

**Key words** *Argopecten irradians*, Metallothionein gene, EST, cDNA library