

厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)金属硫蛋白 MT-10: cDNA 克隆、结构分析及铜离子胁迫下的表达*

王昊盛 宋鑫金 董文强 吴 斌 陈永霞 卢玮筱 祁鹏志^① 郭宝英

(浙江海洋大学 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316022)

摘要 近年来我国沿海海域重金属污染日趋严重, 软体动物尤其是双壳贝类响应重金属污染胁迫的研究发展成为目前的研究热点。金属硫蛋白是一类广泛存在于生物体内富含半胱氨酸(Cys)的小分子蛋白, 具有结合金属离子的能力, 能有效调节生物体细胞内的金属离子平衡, 具有清除自由基, 重金属解毒的功能, 关于厚壳贻贝 MT 蛋白的研究尚未见报道。本文首次利用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增技术克隆了厚壳贻贝 MT-10 蛋白 cDNA 全长(*Mc-MT-10*), 其包含 101bp 的 5' UTR 区, 108bp 的 3'UTR 区以及 222bp 的 ORF 区, 编码 73 个氨基酸。经比对发现 *Mc-MT-10* 富含 Cys, 且具有 9 个软体动物中常见的 CXC 结构以及 CKCXXXCXCX 结构, 系统进化树中同科或属中 MT-10 聚合成一个分支, 显示出高度保守性。采用 Q-PCR 技术分析了 MT-10 mRNA 在 Cu²⁺胁迫下厚壳贻贝外套膜及消化腺中表达变化, 结果表明 *Mc-MT-10* mRNA 在 Cu²⁺胁迫下两种组织中的表达量急剧升高, 说明 Cu²⁺能够诱导 *Mc-MT-10* mRNA 的表达, 并且表现出诱导具有阈值性特点。研究结果可为深入研究厚壳贻贝 MT 蛋白的功能奠定基础, 为厚壳贻贝抗重金属污染新品种选育提供数据支持。

关键词 厚壳贻贝; 金属硫蛋白基因; 荧光定量 PCR; 铜胁迫

中图分类号 Q789; Q955 **doi:** 10.11693/hyh20170300056

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*), 属贻贝目 (Mytiloida)、贻贝科 (Mytilidae)、贻贝属 (*Mytilus*), 是海洋双壳贝类中生长速度最快的种类之一。主要分布于我国黄渤海、东海、台湾等地, 在日本北海道、韩国济州岛等地也有分布。随着工业进程的不断深入, 给沿海海域环境带来巨大压力, 工业废水、船舶油污、生活污水等造成的海水污染不断加剧, 许多重金属严重超标(郭远明等, 2012)。重金属不易降解, 在食物链中不断富集, 人类食用富含重金属的鱼虾贝等海产品会产生中毒现象, 对健康危害极大(Shuai *et al.*, 2001)。双壳贝类对重金属具有较强的生物富集能力, 且活动性低, 是天然的重金属污染指示物。其在重金属胁迫下的变化可间接反映在高浓度金属离子胁迫下生物机体内的氧化反应程度, 是指示环境污染的

重要标志(Moore *et al.*, 2004)。贻贝作为重金属污染指示物在很多国家已经得到应用(Miller, 1999), 相关基础研究也逐渐得到重视。但现阶段国内外对贻贝的研究主要集中于翡翠贻贝与紫贻贝, 对厚壳贻贝的研究主要集中在人工育苗养殖(常抗美等, 2007), 遗传特异性(Ye *et al.*, 2012)以及营养成分比对分析(Kim *et al.*, 2012)等方面。本研究旨在填补贻贝属中厚壳贻贝的作为重金属污染指示物研究, 为今后对厚壳贻贝进行更加全面深入的科研提供基础。

金属硫蛋白(metallothioneins, MT)是一种富含半胱氨酸(Cys)及金属离子的小分子蛋白。通常含有 CC、CXC 等结构, 因为半胱氨酸(Cys)能与重金属离子结合因而取名金属硫蛋白, 在一定程度上起到重金属解毒和自由基清除等修复作用(刘维青等, 2006)。MT

*浙江省公益项目, 2017C32009 号; 浙江海洋大学科研启动资金项目, 21105013615 号。王昊盛, E-mail: wanghaosheng1234@163.com

① 通讯作者: 祁鹏志, 博士, 助理研究员, E-mail: qpz2004@sina.com

收稿日期: 2017-03-15, 收修改稿日期: 2017-04-03

蛋白在生物体内的表达水平通常也反映了该生物对重金属的应激及自我修复能力, 同时也能作为环境中重金属浓度的指示物。近年来国内外已经出现了许多关于生物体内 MT 的报道(Wang *et al.*, 2011), 主要集中于各种鱼类(Olsson *et al.*, 1998; Roeva *et al.*, 1999)和水生无脊椎动物(Roesijadi *et al.*, 1991), 以及大量的软体动物(Isani *et al.*, 1997; Langston *et al.*, 1998)和甲壳动物(Roesijadi *et al.*, 1997; Engel *et al.*, 1993; Barka, 2000)。但厚壳贻贝 MT 基因的研究尚未见报道。本研究通过 RACE 技术克隆了厚壳贻贝 MT-10 全长 cDNA 序列, 通过铜离子胁迫, 模拟当前海洋环境重金属污染现状, 通过对厚壳贻贝细胞内 MT-10 mRNA 相对表达量的测定及分析, 论证厚壳贻贝遭遇重金属污染之后的应激行为及对重金属的自我修复能力, 为厚壳贻贝今后作为海洋环境中重金属浓度指示物提供理论基础。同时也为解决当前厚壳贻贝养殖业面对海洋重金属污染的困境提供一定建议。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本次实验所用的厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)于 2016 年 10 月采集于舟山东极青浜岛附近海域, 外壳平均长度为(9.25±0.43)cm, 壳宽(4.51±0.3)cm, 壳高(3.05±0.20)cm, 湿重(60.18±6.45)g。清污后置于蓝色养殖桶内暂养, 每天换取经过过滤的海水, 10d 之后选择生命特征明显的个体进行对照实验。

1.2 方法

1.2.1 铜离子胁迫 将选择后的厚壳贻贝随机分为两组, 每组 40 只。实验组海水中加入硫酸铜作为铜离子源, 使 Cu^{2+} 终浓度为 20 $\mu\text{g/L}$ 。每天换水一次, 更新一半并在实验组中添加硫酸铜维持 Cu^{2+} 浓度。

1.2.2 RNA 提取及逆转录 处理后 2d、5d、10d、15d、21d、28d 进行取样。对照组和实验组随机取出 4 个的厚壳贻贝, 解剖得到外套膜及消化腺存放于-80℃冰箱内暂存。采集厚壳贻贝腮、性腺、消化腺、血细胞、肾脏、肌肉及外套膜组织, 存放于-80℃冰箱内暂存。待样品全部采集完成之后带回实验室提取总 RNA。RNA 提取采用常规 TRIzol RNA 提取方法进行, RNA 提取完成后立即进行逆转录, 逆转录步骤参考 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书。

1.2.3 引物设计及 *Mc-MT-10* 全长 cDNA 克隆 通过 NCBI 查找并下载已知的双壳贝类 MT 蛋白氨基酸序列并进行序列比对, 在保守区设计一对特异引物

MT-F: ATGSCTGCACCTTGTAAGTGYATY, MT-R: TCAYTTGCAGGARCANCCAGRTKC, 克隆 *Mc-MT-10* 基因部分 cDNA 片段, 并送武汉转导生物科技有限公司进行 Race 测序。

1.2.4 *Mc-MT-10* 荧光定量分析 逆转录后的 cDNA 为模板稀释后作为 Q-PCR 的模板, 以厚壳贻贝 β -actin 为内参, MT-F、MT-R 为引物进行 Q-PCR 实验, 分析 *Mc-MT-10* 组织表达谱及铜离子胁迫下的表达变化。

1.2.5 数据处理及分析 运用最小二乘法 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法(Livak *et al.*, 2001)处理 Q-PCR 数据, 以溶解曲线判定扩增产物的特异性, 利用 SPSS 13.0 软件对数据进行分析, 采用单因子方差分析显著性差异。通过 Oligin 软件对数据进行处理并导出柱状图。

2 结果与分析

2.1 *Mc-MT-10* 基因分析

经 Race 测序获得 *Mc-MT-10* 基因 cDNA 全长序列(图 1), 注册序列号为 KX987251。该序列全长为 431bp, 包含 101bp 的 5'-UTR 区, 108bp 的 3'-UTR 区, ORF 区全长为 222bp, 推导其编码 73 个氨基酸。预测其分子量为 72.81kDa, 等电点为 7.24。其分子式为 $\text{C}_{274}\text{H}_{460}\text{N}_{86}\text{O}_{101}\text{S}_{22}$, 含 943 个原子。预测分子量大小和等电点分别为 76.11kDa 和 9.027, 原子总数 10747, 分子式 $\text{C}_{3365}\text{H}_{5400}\text{N}_{950}\text{O}_{1005}\text{S}_{27}$, 不稳定系数 44.34。用 Clustal W 软件将 *Mc-MT-10* 氨基酸序列与其他物种 MT-10 序列进行比对(图 2), 发现 19 个保守的 Cys, 其

10	20	30	40	50	60
TTTGTGGCATCGGGCAGGTCGGGGCGTCGGGAAGGGCGCGCATGGGGCTGGCCGGGC					
70	80	90	101		
GGGGGCTGTATACTCTGAGGACATACTACGTCGAATTAATA					
111	121	131	141	151	161
ATGCCAGCACCTTGTAACTGCATCGAAACAAATGTTTGTATCTGTGCCACTGGGTGCAGC					
M P A P C N C I E T N V C I C A T G C S					
171	181	191	201	211	221
GATCAGGGTGTGCTGTGGTGACGCTTGAAGTGTTCGGGCGATGACTGTAAATGTTCT					
D Q G C R C G D A C K C S G D D C K C S					
231	241	251	261	271	281
GGTTGTAAAGTAGTTTGCAAGTGTTCAGGTACTTGTGCGTGTGAAGGAGGATGTACGGGA					
G C K V V C K C S G T C A C E G G C T G					
291	301	311	323		
CCTAAACGTGTAAATGTGAACCTGGCTGCTCCTGCAAAATGA					
P K T C K C E P G C S C K *					
333	343	353	363	373	383
ATCAAAAAGACCATATACTGTAACCTTCTCCATGCATCAACCATTCATATTGTATTAA					
393	403	413	423	431	
ATTCCTGTTCAGCAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA					

图 1 厚壳贻贝 MT-10 基因 cDNA 及氨基酸序列

Fig.1 The whole sequence of cDNA and deduced amino acid sequence of *Mc-MT-10*

<i>M. edulis</i>	MPGPPCNCIETNVCI ^c GTGCGGKC ^c CRG ^c GDACKCAS..GCGC	38
<i>P. viridis</i>	MPSPCNCIETQVCI ^c GTGCSGEGCRG ^c GDACKSSGCGCGC	40
<i>B. azoricus</i>	...PCNCVETNVCI ^c CDTGCSEGCRC ^c GDACKCSGA.DCKC	36
<i>B. thermophilus</i>	...PCNCVETNVCI ^c CDTGCSDGCRG ^c GDACKCSGA.DCKC	36
<i>M. coruscus</i>	MPAPCNCIETNVCI ^c ATGCS ^c DQGCRC ^c GDACKCSGD.DCKC	39
<i>C. virginica</i>	MSDPCNCTETGTVC ^c SNSCPATGCKG ^c PGCKCGD..ECKC	38
<i>C. gigas</i>	MSDPCNCTESGTVC ^c SDSCPATGCKG ^c PGCKCGD..GCKC	38
<i>O. edulis</i>	MSDPCNCKTTGNCL ^c SDTCPSTG ^c CNCASGCKCGA..GCKC	38
	c c c c c c c c	
<i>M. edulis</i>	SGCEVVCKC.S.GTCA ^c CG.CDRTGPTNCKC..ESGCSCK.	72
<i>P. viridis</i>	SGCKVVCKCQP.GECA ^c CG.KQCTGPDTCCKC..DSSCSCK.	75
<i>B. azoricus</i>	SGCKVVCKCS..GSCA ^c CE.GGCTGPSTCKC..APACSC..	69
<i>B. thermophilus</i>	SGCKVVCKCSA.GSCE ^c CG.KGCTGPSTCRG..APGCSCK..	70
<i>M. coruscus</i>	SGCKVVCKCS..GTCACE.GGCTGPKTCKC..EPGCSCK.	73
<i>C. virginica</i>	AGCKVKCNCSSEGGCKG ^c DEKCTGPATCKC..ESGCSCKK	76
<i>C. gigas</i>	SGCKVKCNCS..GTCGCG.KGCTGFPENCKCANDSGCGCKK	75
<i>O. edulis</i>	PGCQIVCKCN..STCA ^c CG.VGCTGPDTCCKA ^c ADSGCSCK.	74
	c c c c tgp c c c c	

图 2 MT-10 蛋白氨基酸多序列比对

Fig.2 The multiple alignments of amino acid sequences of MT-10s
注: 黑色阴影部分为保守的 CXC 结构, 黑色方框为 CKCXXXCXCX 结构

中 9 对 Cys 与其相邻的氨基酸构成 9 个 CXC 结构。另外, CKCXXXCXCX 结构也是软体动物金属硫蛋白常见的保守结构, 在 *Mc-MT-10* 蛋白序列中也发现存在一个类似结构域。

构建了基于 Neighbor-joining 的系统进化树, boot 值为 5000(图 3)。在进化树中, *Mc-MT-10* 首先与同属物种 *M. galloprovincialis* 的 MT-10 聚合在一起, 通过单序列比对, *Mc-MT-10* 与 *Mg-MT-10* 核苷酸相似度为 93.15%。而后与同属或科中的同源物聚合成一个大的分支, 与脊椎动物的相距较远。厚壳贻贝 MT-10 的进化地位与厚壳贻贝的生物学分类地位基本一致, 显示了较强的保守性。

2.2 *Mc-MT-10* 基因组织表达分析

用 qRT-PCR 技术检测了 *Mc-MT-10* 基因在厚壳贻贝腮、肌肉、消化腺、外套膜、血细胞、性腺和肾脏等组织中的表达情况, 结果表明 *Mc-MT-10* 基因在各组织中均有表达, 在消化腺中的表达量最高, 其次为腮、血细胞和肾脏, 在肌肉、外套膜和性腺中的表达量最低(图 4)。

2.3 铜离子胁迫下 *Mc-MT-10* 基因表达分析

用 qRT-PCR 技术检测了厚壳贻贝外套膜和消化腺 *Mc-MT-10* 基因在 Cu^{2+} 胁迫下的表达情况(图 5, 图 6)。实验结果表明: 铜离子胁迫下, 外套膜和消化腺 *Mc-MT-10* 基因呈现类似的表达模式。处理 2d 时, *Mc-MT-10* 基因表达量显著升高, 5d 时, 表达量达到峰值, 而后逐渐下降, 处理 15d 时, 消化腺 *Mc-MT-10*

基因表达量已回落至正常水平, 实验结束时(28d), 外套膜 *Mc-MT-10* 基因表达量回落至接近正常水平。但两种组织 *Mc-MT-10* 基因表达量变化并不完全相同, 外套膜中 *Mc-MT-10* 基因表达量变化显著高于消化腺。

3 讨论

金属硫蛋白一类广泛存在于生物界的低分子量蛋白, 富含半胱氨酸, 由于 Cys 巯基能共价结合金属离子, 是金属结合位点, 因此其对多种重金属, 如铜、镉及锌具有高度亲和性, 可参与生物体中对金属元素的解毒过程(Coyle *et al*, 2002)。本研究, 厚壳贻贝 MT-10 蛋白含有 19 个 Cys 残基, 含量达 26.0%, 显示其发达的金属结合能力, 这与在其他软体动物的报道相一致(Engelken *et al*, 1999; 吕达等, 2012)。CXC 结构是软体动物 MT 蛋白的显著特征, 结果发现厚壳贻贝 MT-10 蛋白含有 9 个 CXC 结构, 经序列比对, 发现此类 CXC 结构在软体动物 MT 蛋白中的高度保守。有研究认为, 软体动物 MT 蛋白还存在保守的 CKCXXXCXCX 结构(Imagawa *et al*, 1990), 本研究发现厚壳贻贝 MT-10 蛋白也存在一个这样的结构域, 同大部分软体动物的发现相一致, 但在海湾扇贝(*Argopecten irradians*)MT 蛋白中却存在两个类似结构, 而且其包含 145 个氨基酸, Cys 含量高达 27.6, 显示了更强的重金属结合能力, 可能是两物种进化过程所处环境差异造成的, *A. irradians* 在进化过程中所面对的重金属环境压力更大(刘维青等, 2006)。基于

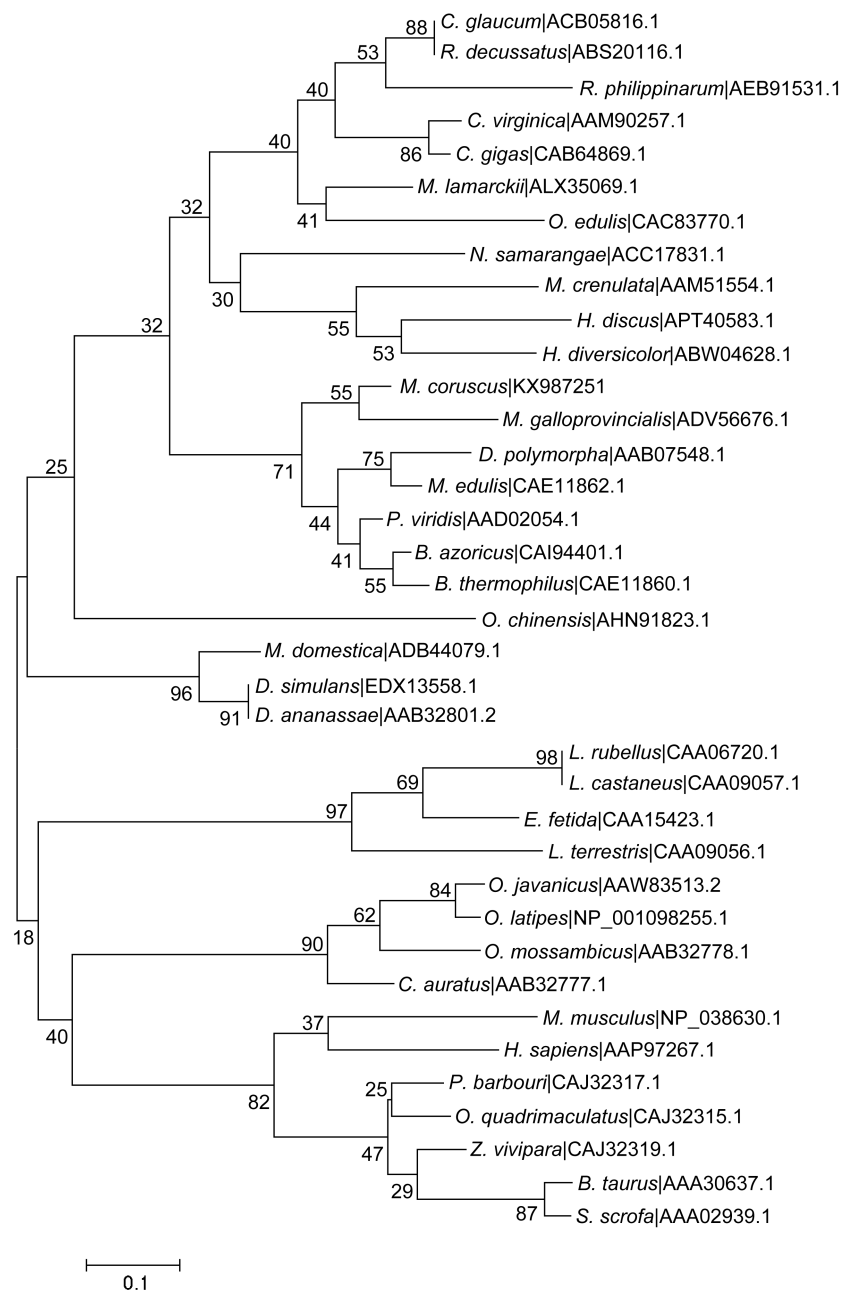


图 3 基于 Neighbor Joining 的系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree constructed based on Neighbor Joining method

Neighbor-joining 的系统进化树表明厚壳贻贝 MT-10 的进化地位与厚壳贻贝的生物学分类地位基本一致, 显示了较强的保守性。

厚壳贻贝 MT-10 的组织表达谱表明, MT-10 在各组织中是广泛存在的, 显示其广泛参与各类生命活动。而在消化腺以及腮、血细胞和肾脏中的表达量较高, 在软体动物中此类组织均为重要的免疫组织, 参与对外界刺激的应急、防御及免疫调控等, 进一步表明 MT-10 蛋白在厚壳贻贝中发挥重要的防御作用。

一些学者认为, 生物体内 MT 蛋白响应重金属胁迫呈现倒“U”型模式(Hermesz *et al*, 2001; Chan *et al*, 2004; Wu *et al*, 2006), MT 蛋白适应重金属胁迫有一个剂量阈值, 即当重金属达到某一浓度时, 金属硫蛋白会随重金属剂量增加而上升, 一旦超出该浓度阈值, 重金属就会对生物体产生不可逆的毒性, 金属硫蛋白水平就会随重金属水平增加而降低。本研究发现, 随着处理时间的不断延长, MT-10 蛋白的表达量逐渐升高, 到达峰值后逐步回落。在组织细胞吸收的铜离

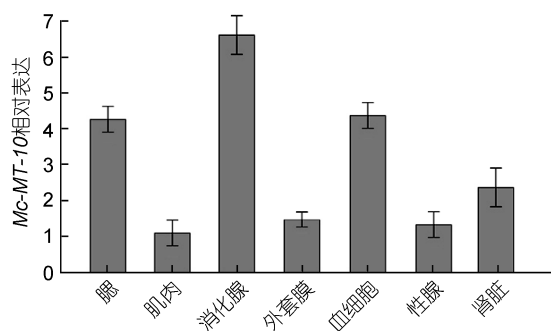


图4 厚壳贻贝 MT-10 mRNA 组织表达谱

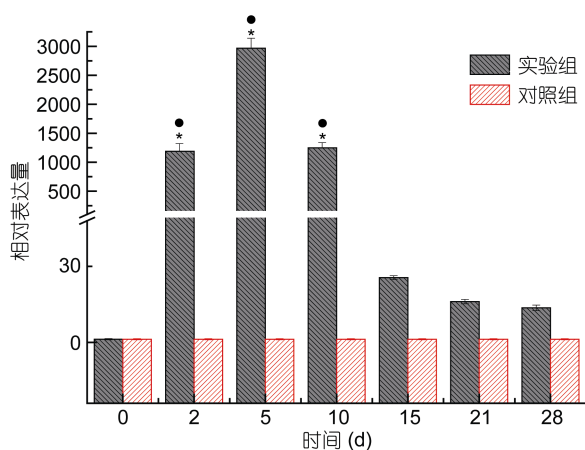
Fig.4 The tissues distributions of MT-10 mRNA in *M. coruscus*

图5 铜离子胁迫下厚壳贻贝外套膜组织 MT-10 mRNA 表达变化

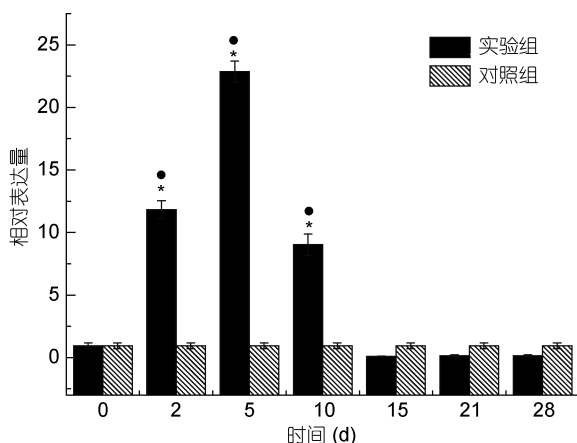
Fig.5 The expression analysis of MT-10 mRNA in mantle of *M. coruscus* under Cu^{2+} stress

图6 铜离子胁迫下厚壳贻贝消化腺组织 MT-10 mRNA 表达变化

Fig.6 The expression analysis of MT-10 mRNA in digestive glands of *M. coruscus* under Cu^{2+} stress

子剂量不断增加的情况下, 确实出现了典型的倒“U”型模式。研究表明, 在 $20\mu\text{g/L}$ 铜离子胁迫下, 厚壳贻贝细胞内铜离子浓度阈值出现的时间在 5d, 5d

后 MT-10 蛋白的表达量就逐渐下降, 15d 后其表达量回落至正常水平。

4 结论

厚壳贻贝作为一种具有重要经济价值的海洋双壳贝类, 其作为环境指示生物的作用近年来也逐渐引起人们重视。本研究首次克隆了厚壳贻贝 MT-10 蛋白全长 cDNA 序列, 分析其结构特征, 并对其响应重金属胁迫的 mRNA 表达变化进行了初步研究。研究结果可为深入研究厚壳贻贝 MT 蛋白的功能奠定基础, 为厚壳贻贝抗重金属污染新品种选育提供数据支持, 为降低贻贝养殖业风险提供了重要依据。

参 考 文 献

- 刘维青, 倪多娇, 宋林生等, 2006. 海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 金属硫蛋白基因的克隆与分析. 海洋与湖沼, 37(5): 444—449
- 吕 达, 罗凯娅, 潘宝平等, 2012. 青蛤 (*Cyclina sinensis*) 金属硫蛋白及硫氧还蛋白基因的克隆与表达分析. 海洋与湖沼, 43(1): 47—51
- 郭远明, 刘 琴, 顾 捷等, 2012. 4 种海洋贝类对海水中铜 (Cu) 的富集能力. 水产学报, 36(5): 708—713
- 常抗美, 吴剑锋, 2007. 厚壳贻贝人工繁殖技术的研究. 南方水产, 3(3): 26—30
- Barka S, 2000. Processus de détoxication et localisation tissulaire des métaux traces (cuivre, zinc, nickel, cadmium, argent et mercure) chez un crustacé marin *Tigriopus brevicornis* (Müller). Etude du biomarqueur “protéines type métallothionéines”, de la bioaccumulation des métaux et des conséquences sur le transfert trophique. Paris: Université de Paris
- Chan P C, Shiu C K M, Wong F W Y *et al*, 2004. Common carp metallothionein-1 gene: cDNA cloning, gene structure and expression studies. Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression, 1676(2): 162—171
- Coyle P, Philcox J C, Carey L C *et al*, 2002. Metallothionein: The multipurpose protein. Cellular and Molecular Life Sciences, 59(4): 627—647
- Engel D W, Brouwer M, 1993. Crustaceans as models for metal metabolism: I. Effects of the molt cycle on blue crab metal metabolism and metallothionein. Marine Environmental Research, 35(1—2): 1—5
- Engelken J, Hildebrandt A, 1999. cDNA cloning and cadmium-induced expression of metallothionein mRNA in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Biochemistry and Cell Biology, 77(3): 237—241
- Hermesz E, ábrahám M, Nemcsók J, 2001. Tissue-specific expression of two metallothionein genes in common carp during cadmium exposure and temperature shock. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 128(3): 457—465
- Imagawa M, Onozawa T, Okumura K *et al*, 1990.

- Characterization of metallothionein cDNAs induced by cadmium in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Journal*, 268(1): 237—240
- Isani G, Serra R, Cattani O *et al*, 1997. Adenylate energy charge and metallothionein as stress indices in *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium and anoxia. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 77(4): 1187—1197
- Kim E K, Joung H J, Kim Y S *et al*, 2012. Purification of a novel anticancer peptide from enzymatic hydrolysate of *Mytilus coruscus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(10): 1381—1387
- Langston W J, Bebianno M J, Burt G R, 1998. Metal handling strategies in molluscs. In: Langston W J, Bebianno M J eds. *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Dordrecht: Springer, 219—283
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 25(4): 402—408
- Miller B S, 1999. Mussels as biomonitors of point and diffuse sources of trace metals in the clyde sea area, Scotland. *Water Science and Technology*, 39(12): 233—240
- Moore M N, Depledge M H, Readman J W *et al*, 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 552(1—2): 247—268
- Olsson P E, Kling P, Hogstrand C, 1998. Mechanisms of heavy metal accumulation and toxicity in fish. In: Langston W J, Bebianno M J eds. *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Dordrecht: Springer, 321—350
- Roesijadi G, Fowler B A, 1991. Purification of invertebrate metallothioneins. *Methods in Enzymology*, 205: 263—273
- Roesijadi G, Brubacher L L, Unger M E *et al*, 1997. Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen species in molluscan hemocytes exposed to cadmium in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 118(2): 171—176
- Roeva N N, Sidorov A V, Yurovitskii Y G, 1999. Metallothioneins, proteins binding heavy metals in fish. *Biology Bulletin*, 26(6): 617—622
- Shuai J S, Wang L, 2001. Discussion about the health impact of heavy metal and the countermeasure. *Environment and Exploitation*, 16(4): 62
- Wang Q, Ning X X, Chen L L *et al*, 2011. Responses of thioredoxin1 and thioredoxin-related protein 14 mRNAs to cadmium and copper stresses in *Venerupis philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154(3): 154—160
- Wu S M, Jong K J, Lee Y J, 2006. Relationships among metallothionein, cadmium accumulation, and cadmium tolerance in three species of fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 76(4): 595—600
- Ye Y Y, Li J, Wu C W *et al*, 2012. Genetic analysis of mussel (*Mytilus coruscus*) populations on the coast of East China Sea revealed by ISSR-PCR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 45: 1—6

THE CDNA CLONING AND CHARACTERIZATION OF *MYTILUS CORUSCUS* METALLOTHIONEIN 10 AS WELL AS ITS MRNA EXPRESSION UNDER THE Cu^{2+} STRESS

WANG Hao-Sheng, SONG Xin-Jin, DONG Wen-Qiang, WU Bin,
CHEN Yong-Xia, LU Wei-Xiao, QI Peng-Zhi, GUO Bao-Ying

(Zhejiang Ocean University, National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhoushan 316022, China)

Abstract In this paper, a 413bp full-length cDNA sequence of metallothionein 10 from thick shell mussel was obtained with RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique (so called '*Mc-MT-10*' thereafter). It consists of a 101bp 5'untranslated region (UTR), an 222bp open reading frame (ORF) and a 108bp 3'UTR. The translated protein is composed of 73 amino acids. The multiple alignments showed the abundant Cys residues, 9 conserved CXC domains and one CKCXXXCXCX domain, in addition, the *Mc-MT-10* cluster into one branch with the counterparts from congeneric species in the phylogenetic tree, suggesting the high evolutionary conservation. The Q-PCR assays were employed to assess the relative expressive changes of *Mc-MT-10* mRNA in mantle and digestive gland under the stress of copper ions. The results showed that the expression levels of *Mc-MT-10* mRNA rose sharply under the stress of Cu^{2+} , implying that the *Mc-MT-10* could involve in the regulation of thick hell mussel against Cu^{2+} stress.

Key words *Mytilus coruscus*; metallothionein; Real-time fluorescence quantitative PCR; Cu^{2+} stress