

马氏珠母贝基质金属蛋白酶基因 *MMP-17* 的克隆及表达分析

罗少杰¹, 闫芳¹, 郑哲¹, 田荣荣¹, 邓岳文^{1,2}, 焦钰^{1*}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025;

2. 广东省珍珠养殖与加工工程技术研究中心, 广东 湛江 524025)

摘要: 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)是一种能够降解细胞外基质的蛋白水解酶。MMP-17 是一种膜型基质金属蛋白酶,通过糖基磷脂酰肌醇连接于细胞表面,参与调控有机体的内环境稳定、宿主防御等多种生理过程。为研究 MMP-17 在马氏珠母贝免疫反应中的作用,实验运用 RACE 技术,克隆得到马氏珠母贝 *MMP-17* (*Pinctada martensii MMP*, *Pm-MMP-17*) 基因 cDNA 全长序列,并对其序列特征及功能进行初步分析。结果显示, *Pm-MMP-17* 基因 cDNA 全长 2 794 bp, 开放阅读框(ORF)为 1 923 bp, 编码 640 个氨基酸, 5'UTR 长 156 bp, 3'UTR 长 715 bp, 分子量约为 73.11 ku, 等电点为 8.98; 多序列比对和系统进化树分析表明, *Pm-MMP-17* 与其他物种的 MMP 具有较高的保守性, 与长牡蛎的 MMP-17 相似性高达 82%; 功能结构域分析表明, *Pm-MMP-17* 有 5 个高度保守的结构区域: N-末端的信号肽、前导区、催化区、铰链区和 C-末端的类血红素结合蛋白区; 荧光定量数据分析表明, *Pm-MMP-17* 基因在马氏珠母贝的闭壳肌、珍珠囊、足、外套膜、血淋巴、肝胰腺、性腺、鳃等 8 个组织中均有表达, 在血液中的表达量最高, 闭壳肌和鳃次之; 脂多糖(LPS)刺激后, *Pm-MMP-17* 基因表达水平上调, 12 h 后达到最大值, 之后又逐渐下调并恢复到正常水平。研究表明, *Pm-MMP-17* 基因可能在马氏珠母贝的免疫反应中起着重要作用。

关键词: 马氏珠母贝; *Pm-MMP-17* 基因; 克隆; 荧光定量; 表达分析

中图分类号: Q 786; S 968.3

文献标志码: A

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是指分布在细胞表面或细胞之间的大分子,主要由胶原蛋白、弹性蛋白、蛋白多糖和糖蛋白等组成,其在维持正常组织结构和功能以及细胞生长和分化中起着重要作用^[1]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类高度保守的以锌离子为辅酶,能降解细胞外基质,且广泛分布在植物和动物中的一类蛋白水解酶。大部分 MMPs 的结构都包括 5 个部分:信号肽区、前导区、催化区、铰链区和类血红素结合蛋白区^[2-4]。

活性 MMPs 几乎能够在生理和病理条件下降解细胞外基质的所有基质成分^[2-3,5]。依据 MMPs 底物特异性及结构的不同,可将其分为 5 类:胶原酶(collagenases)、明胶酶(gelatinases)、基质溶素/间质溶解素(stromelysins)、膜型金属蛋白酶(membrane type-MMPs, MT-MMPs)及其他 MMPs^[6]。MMP-17, 又称为 MT4-MMPs, 通过糖基磷脂酰肌醇(glycosyl-phosphatidylinositol, GPI)连接于细胞表面^[7-8], 对合成底物具有专一性,可降解明胶,活化明胶酶原 A。研究表明 MMP-17 在脑、结肠、卵巢和白细胞中均

收稿日期:2015-01-24 修回日期:2015-05-28

资助项目:国家自然科学基金(31272635, 31372526, 41206141); 广东海洋大学博士启动项目(1212318)

通信作者:焦钰, E-mail: jiaoyu1981@hotmail.com

有较高的表达,通过降解 ECM 参与调控有机体的内环境稳定、肿瘤的侵袭等多种生理过程^[1,7,9-11]。不仅如此,*MMP-17* 还可以通过调节细胞因子(如 TNF- α)的活性参与调控机体的免疫防御和炎症发生^[12]。

马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 是我国培育海水珍珠的主要贝类。但近年来,随着贝类养殖面积扩大以及长期持续的养殖,马氏珠母贝的海水珍珠产量和质量明显下降,病害也变得越来越。鉴于 *MMP-17* 在炎症反应和免疫防御等生理病理过程中的重要作用,本实验以马氏珠母贝为研究对象,依据实验室前期构建的马氏珠母贝珍珠囊转录组数据库^[13],筛选与 *MMP-17* 基因高度相似的 unigene 片段,通过 RACE 技术获得马氏珠母贝 *MMP-17* 基因 (*Pinctada martensii-MMP-17*, *Pm-MMP-17*) 的序列全长,并对该序列进行了结构和同源分析;同时利用荧光定量 PCR 技术分析其在马氏珠母贝组织间的表达差异以及脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激后不同时间点血液中的时序表达。本实验为进一步探索 *MMP-17* 在马氏珠母贝中的免疫防御机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验贝及菌株 实验所用的马氏珠母贝均来自广东岸华集团珍珠养殖基地(徐闻县西连镇大井村),均为两龄贝,大小为 6~8 cm。

基因克隆的材料来自马氏珠母贝血细胞;荧光定量材料来自马氏珠母贝血细胞、鳃、外套膜、闭壳肌、肝胰脏、珍珠囊、性腺和足。所用材料取后立即放入液氮冷冻保存,备用。宿主菌 *E. coli* DH5 α 保存于实验室 -80 °C 冰箱中。

主要试剂 总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司; Reverse Transcriptase M-MLV (RNaseH)、pMD 18-T vector、DNA Marker、LA Taq DNA 聚合酶等均购自大连宝生物工程有限公司; SYBR Premix ExTaqTM 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; SMARTerTM RACE cDNA Amplification kit 购自 Clontech 公司; 胶回收试剂盒购自全式金公司; 脂多糖购自 sigma 公司。

1.2 实验方法

引物设计 从马氏珠母贝珍珠囊转录组文库^[13]中筛选与 *MMP-17* 基因高度相似的 unigene 片段,利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计基因全长克隆引物与荧光定量引物(表 1)。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

| 引物 primer | 序列(5'-3') sequence(5'-3') | 用途 usage |
|------------------------------|------------------------------|-------------|
| <i>MMP-17</i> -5'-RACE-outer | CGGTGCTCCAAACTTGAAAGGCGTCC | 5'-RACE |
| <i>MMP-17</i> -5'-RACE-inner | TTCTCCTGCTCTCGACTGGCTTTGG | 5'-RACE |
| <i>MMP-17</i> -middle-F | ATGATACAGTTCGCTCCG | 中间片段 |
| <i>MMP-17</i> -middle-R | TCCCTTTTTGGGTGTGTGA | 中间片段 |
| <i>MMP-17</i> -3'-RACE-outer | GCGAGTGGACAAGAAGTATCCCAAACC | 3'-RACE |
| <i>MMP-17</i> -3'-RACE-inner | ACGTATATGACAATAGACGGCGAAGCTG | 3'-RACE |
| <i>GAPDH</i> -F | CACTCGCCAAGATAATCAACG | 内参基因(荧光定量) |
| <i>GAPDH</i> -R | CCATTCTGTCAACTTCCCAT | 内参基因(荧光定量) |
| <i>M13</i> -F | CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC | 菌落 PCR 检测 |
| <i>M13</i> -R | GAGCGATAACAATTCACACAGG | 菌落 PCR 检测 |
| <i>MMP-17</i> -qPCR-F | CTCAAAGGATGGCAACATA | 荧光定量 |
| <i>MMP-17</i> -qPCR-R | CTGGGAGATCAGGAGTGTAGTTC | 荧光定量 |

总 RNA 提取和第一链 cDNA 的合成 参照 Trizol 试剂盒说明提取马氏珠母贝各组织(闭壳肌、珍珠囊、足、外套膜、血淋巴、肝胰腺、性腺、鳃)的总 RNA。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop ND1000 紫外分光光度计分别检测 RNA 的完整性和纯度。荧光定量 cDNA 模板的合成依据 Reverse Transcriptase M-MLV (RNaseH) 说明进行, 5' RACE 和 3' RACE 模板的制备参照 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 的说明进行。

cDNA 末端快速扩增(RACE) 为了增加扩增的特异性,采用巢式 PCR 进行 3'和 5'末端序列的扩增,PCR 扩增体系共 25 μL :模板 cDNA 2 μL ,Premix LA Taq Hot start 12.5 μL ,MMP-17-5'-outer(10 μm) 1 μL ,UPM(10 μm) 1 μL ,灭菌 ddH₂O 8.5 μL 。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min,25 Cycles;72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。不同的引物可适当的调节退火温度。在进行巢式二次扩增时,应将引物更换为 MMP-17-5'-inner 和 NUP,循环数调整为 30,其他均不变。3'端扩增利用巢式引物 MMP-17-3'-outer、MMP-17-3'-inner 进行,操作步骤同上。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收目的条带,将回收产物与 pMD 18-T 载体连接,并进行转化,挑取阳性克隆样品,送上海生工生物工程技术有限公司测序。

序列分析 将测序结果与已知的 MMP 片段进行重叠拼接,得到 *Pm-MMP-17* 基因的 cDNA 全长。预测基因的开放阅读框(ORF)和氨基酸序列用在线工具 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>);通过 SignalP 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽;通过使用 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)对氨基酸序列的理化性质进行分析;通过 ExPASy(<http://www.expasy.org/vg/index/protein>)分析蛋白质的疏水性;Motif(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan#prf:TIR)搜索蛋白质的功能位点;SOPMA(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)和 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)在线预测蛋白质结构。使用 DNAMAN 软件对氨基酸多序列进行比对。

荧光定量检测组织表达差异 采用荧光定量的方法,检测 *Pm-MMP-17* 基因在正常贝体中的组织表达情况。用逆转录酶 M-MLV Reverse Transcriptase 反转得到马氏珠母贝血细胞、鳃、外套膜、闭壳肌、肝胰脏、性腺、珍珠囊和足的 cDNA,荧光定量体系为 10 μL 。反应体系如下:SYBR Premix ExTaq™ 5 μL ,上下游引物各 0.5 μL ,cDNA 模板 0.5 μL ,灭菌水 3.5 μL 。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 35 s,40 个循环,以 GAPDH 为内参。

LPS 刺激后马氏珠母贝 MMP 基因在血液中的表达分析 将 120 只暂养一周的健康马氏珠母贝随机分为两组:实验组、对照组,每组各 60 只贝。采用闭壳肌注射的方法,实验组注射浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 溶液 100 μL ,用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)作溶解液,对照组注射 100 μL 的 PBS。在注射后的 0、3、6、12、24、48 h 从各组中随机取 10 只贝,取血细胞,提取 RNA,反转录为 cDNA 进行实时荧光定量。

数据处理 用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 *Pm-MMP-17* 基因的 cDNA 克隆及序列和结构分析

拼接之后最终得到 *Pm-MMP-17* 基因的 cDNA 全长为 2 794 bp, GenBank 登录号是 KC881251。其中 5'UTR 为 156 bp,3'UTR 为 715 bp 且包括 27 bp 的 polyA 尾;开放阅读框(ORF)为 1 923 bp,共编码 640 个氨基酸,预测蛋白分子量为 73.11 ku,等电点为 8.98(图 1)。氨基酸序列分析表明,*Pm-MMP-17* 具有 MMPs 家族的典型特征序列:N-末端的信号肽、前导区、催化区、铰链区和 C-末端的类血红素结合蛋白区(图 2)。前肽区有一个半胱氨酸开关;催化区中高度保守的 HEXGHXXGXXH 序列,为催化活性中心,并含有一个金属蛋白酶抑制物(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)的结合位点;铰链区是催化区与类血红素结合蛋白相间的区域,富含脯氨酸;在类血红素结合蛋白区有 4 个重复序列。

1 ACATGGGGTACTGTGTACGATTACGGAGCAACCCTCATAAATATATCTCTACCACAATCGAGAGAGTCTGTGGGGCACACTGCTCCATG
 91 TGAATCCCCTTAGTATAAGGTATCAGACAATAGCGGGGAAGGTGTAATTACCTGACGAGAGAAAGatgAGGGGGCCGTGTAATAGACAT
 1 M E G P C N R H
 181 CTAAGTCATACAGACGACAGAAGTACCAGGTCAGCATAAAATATGGTTGTGATAATTGCTTTGTTAGACAGAATAGTTCATCGTCTGCA
 9 L S H T D D R T D R S S I K Y G C D N C F V R Q N S S S S A
 271 TCTTCTAAACCATCATCGTCGTCGTTGTCGTCGAAATGCATCAGCATCGACAAATTCAGAAGTTAGATGTGAAACTGTAAGAAAAAGT
 39 S S K P S S S S L S S A N A S A S T N S E V R C E T V R K S
 361 GGAATTATCAAATCTTTTTCAGAGAGGATGTATCAATGGAGTATACCACCCACGGGCGTTGTTAGTGACTATATTACTATGCATGTAT
 69 G I I K S F S E R M Y Q W S I P P P R A L L V T I L L C M Y
 451 GGGACTATGTGTATGGCCAAGCCAGATAGAGGGGAGGCTATGAAATACCTCAGTCACTTTCATTATCTACCCAAAGCCAGTCGAGAG
 99 G D Y V Y G Q A Q I E G E A M K Y L S H F H Y L P K A S R E
 541 CAGGAGAACCTTTTACATGGAGAAAAATCAAAGAAGCCATTAATAATCTTCAAAGGATGGGCAACATACCGGTCACAGGGAAAGTGGAC
 129 Q E N L L H G E N I K E A I K N L Q R M G N I P V T G K V D
 631 GAACGGACACGGACATTTGATGCATAAAAAACGGTGCGGGGTCGCCACCCTGTGGACGAACTATTCGGAACAGGGCGTGGTCAAGAGG
 159 E R T R T L M H K **K R C G V A D** P V D E L F G T G R G R **R**
 721 AGGAAAAGATACGTGTAGCTCCCAAGTGGAAAAATATGATCTCACATATAGAATATTGAACTACACTCCTGATCTCCAGTATAC
 189 **R K R** Y V L A P T K W K K Y D L T Y R I L N Y T P D L P V Y
 811 TATGTCCGGAAAGCTTTGCTGGACGCCTTTCAAGTTTGGAGCACCGTTACCAAGCTGACTTTTACAGAGTCCATGCATGGTGTGCTGAC
 219 Y V R K A L L D A F Q V W S T V T K L T F T E S M H G D A D
 901 ATTATGATACAGTTCCGCTCCGGATACCATAAAGATGGGTATCCATTCGACGGAAAAGGTTAATTTTGGCTCACGCATTTTCCCGGC
 249 I M I Q F A S G Y H K D G Y P F D G K G L I L A H A F F P G
 991 AAAGGTAAAGGTGGTATACACATTTGACGAGGCCGAGCATTTGACTTTCAATTCGTCAGAGACAGGAGTTGACCTRTTATGGTTGCT
 279 K G K G G D T H F D E A E H W T F N S S E T G V D L F M V A
 1081 GCCCAGAGTTTGGTCACGCCCTGGGCTTAAGCCATAGTAACGAACCCGGGCGCTGATGTATCCATGGTACCAAGGTTATGACCCCAAC
 309 A **H E F G H A L G L S H** S N E P G A L **M** Y P W Y Q G Y D P N
 1171 TTTAAGTGCCTATGATGACATCCGGGAATACAGACAATATATGGCGGTGTGGATCGTTGCCGAGGCCCCACCACAACCCCGCT
 339 F K L P Y D D I R G I Q T I Y G G V G S L P R P P P Q T P R
 1261 CCGAGGACACCAACATCTACCCTACCGTGGGGAGGGGAGGAGGACGCAACCCGACCAAGGTCGAATCGACCCCTGTAATGCT
 369 P R T P N I Y P T G G G G G G R Q P R P K G P I D P C N A
 1351 ACTTTCGATGCCATTTCTGTGATACGTCAGAAGTCTTCTYGTTCATTGGGAAGTACTTTTGGCGCCTTGATCAAGAGGACTAGTTAAA
 399 T **F D A I S V I R Q E V F X F I G K Y F W R L D S R G L V K**
 1441 GGAGAACCTTCAAAATCCATTCGTTCTGGTACAACCTTCTAAAGAGATCGACCATTTTGGTGTATATGAGAGCAAGAAAGACGGG
 429 **G E P L Q I H S F W Y K L P K E I D H F D A V Y E S K K D G**
 1531 AAAATAGTTTCTTTGTTGGTATAGATACTGGCGATTCGACGGTAACTACCCTGTGGTCAACACCCAAAAAGGAAATCCTATTACC
 459 **K I V F F V G D R Y W R F D G N Y P V V N T P K K G N P I T**
 1621 GATTTGGAATTCCTGCGGATATCAAAAAGATAGACCGGTTTATATGGGGTTTCAATCAGAGGACGTAATTGGTTAGCGGGATATG

```

489      D F G I P A D I K K I D A V F I W G F N Q R T Y L V S G D M
1711    TACTGGAAACTCCAGGAGGACCAGGATTACGTGGAACCGGACTATCCCAGGGATATGAACATCTGAAAAACGTCCCGGTCGCCATTGGAT
519      Y W K L Q E D Q D Y V E P D Y P R D M N I W K N V P V P L D
1801    ACTGCATTCCAATACTGGGATGGAAAACTACTTTTTCAAAGACAAGATGGTGTACAAATCTACGATATGAAAATGCGAGTGGACAAG
549      T A F Q Y W D G K T Y F F K D K M V Y K F Y D M K M R V D K
1891    AAGTATCCCAAACAATTAAGAACAATTTCTTGGCTGTAACCAAGCGCATACTATGACAATAGACGGCGAAGCTGAAAACTTAAA
579      K Y P K P I K N N F L G C N Q A H T Y M T I D G E A E K L K
1981    AAGTCTGACAATCTCCGATAAAATCTCCACAGTGTAGTTTTATCATGTCTATGTTAATATTTTCTATACATTCAAGTCAAATTTGT
609      K S D N S S D K I S H S V V L S C L C L I F F Y T F K S N C
2071    GGTTCtgaGAGCGTGTTCGAATAGGAACTTGAATCTTATTCAGTGTTCAAACATTTGATTGAGAGCGTGTTCGAATAAGAGCTTGAGTC
639      G S *
2161    TTATTCAGTGTTCAAACATTGGACCAATCCCGCTTCAGTACTTAATTAGAGGCTTTGAAATCATGTCCATTTCCATCAGTGTCAACAGAC
2251    GGTGAAGTAGTGCTAGATATAGGTACATTTGTATCTATCATACTTCATATTGCATTGCGTCCATCTGTGACTTTAATATTGCTTCGCCA
2341    TCGTGATCGTATCAGAAAGTAAAGCTGACGAACGATGGCTGGCTGGCCATGTAGCTGGTCTTACATGAATGCTCATTGGATGAAATTT
2431    CATATAGCCTGTCTTACATGAATGCTCATTGGATGAATTTTCATGTTGTTTGACTTACATGAATCTCACTGGATGAATTTTCATGTTGC
2521    TTGACTTACATGAATTTTCATTGGATGGGCTTTTCATGACTTTGCTGGCCATGTATATGTAGCTTTTCTAACACATATGCTCATTGGATGA
2611    GTTTTTACCAAATATTTTTCATTTTACTTTTCACTAGTGCAGTTCGTTACAATCGGCAGTAAAACGTTAAAGGTTCTTTATTATAA
2701    TTCCTTAAGGAGTTACTTTAAATTTTAGTCCCATTTTATAAATATTCATAAATTCGTTCTGCACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
2791    AAAAA

```

图1 *Pm-MMP-17* 基因的 cDNA 序列、编码的氨基酸序列

左边加粗和有下划线数字分别表示核苷酸和氨基酸的位置,核苷酸为小写的字母分别表示起始密码子(atg)、终止密码子(tga);两个加框的序列分别表示半胱氨酸开关和激活序列;下划线表示催化区,黑色背景序列表示催化活性中心序列,画圈的氨基酸表示甲硫氨酸残基;斜体表示富含脯氨酸的铰链区;灰色背景表示四个重复序列类血红素蛋白结构域

Fig. 1 The full length cDNA and amino acid sequence of *Pm-MMP-17*

The bold and underline numbers on the left indicate the position of the nucleotide and amino acid, respectively. The initiation codon(atg) and stop codon(tga) are shown by small letters; The two boxed amino acid represent the cysteine switch and activation sequence; The underlined sequence is the catalytic domain; The sequence in black background is the catalytic active site sequence; The circled amino acid is the methionine residue; The proline hinge region is indicated in italic type; The sequence in gray background represents the typical heme protein domain

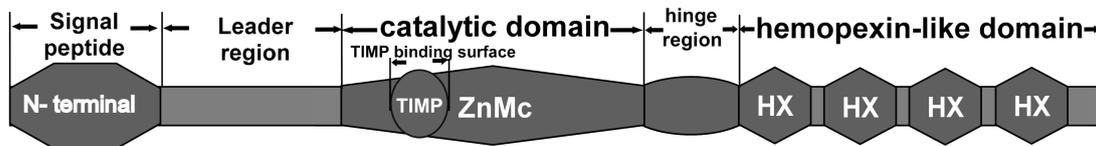


图2 马氏珠母贝 *Pm-MMP-17* 基因的结构模式图

Fig. 2 A scheme depicting the structure of *Pm-MMP-17* gene

2.2 *Pm-MMP-17* 蛋白质理化性质分析

经 ProtParam 对 *Pm-MMP-17* 进行分析,其氨基酸序列中带有正电荷的精氨酸残基(Arg)和赖氨酸残基(Lys)共 85 个,带负电荷的谷氨酸残基(Glu)和天冬氨酸残基(Asp)合计 71 个。动荡指

数(即不稳定系数)为 35.51,被划分为稳定蛋白。

使用 SOPMA 软件对 *Pm-MMP-17* 的二级结构进行预测,发现 α 螺旋结构占整体的 19.69%, β 转角结构 8.28%,延伸链 19.38%,无规则折叠 52.66%。经过 Motif scan 的分析,发现在第 307 ~

316 位序列为 VAAHEFGHAL, 此处为锌结合域识别位点。经 ProtSoale 分析, 得到疏水值 (Grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -0.560, 故 Pm-MMP-17 为亲水蛋白 (图 3)。

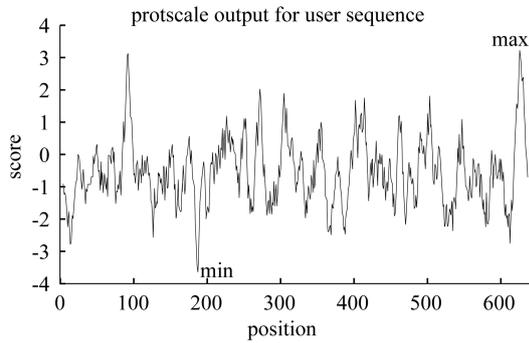


图 3 Pm-MMP-17 蛋白疏水性预测

Fig.3 The hydrophobic prediction of Pm-MMP-17 protein

采用 SWISS-MODEL 分别对 Pm-MMP-17 (图 4-a)、牡蛎 MMP-17 (*Crassostrea gigas*, Cg-MMP-17) (图 4-b) 进行三维结构预测。结果显示两者主要以无规则折叠构成。一般来说, 蛋白质分子的功能实施以及构象等重要部位主要集中在无规则折叠部位, 并由此进一步形成不同的亚群。对比图 4-a 和 4-b, 可以发现 Pm-MMP-17 与 *C. g-MMP-17* 在结构上有很大的相似性, 这也说明了 MMP 在三维结构上的保守性。

2.3 *Pm-MMP-17* 的同源分析及氨基酸序列比对

将克隆得到的 *Pm-MMP-17* 基因的 cDNA 序

| | | |
|-------------------|---|-----|
| <i>P.m-MMP-17</i> | ----MEGPCNRHLSHTDDRTDRSSIKYGCNDCFVRQNSSSSASSKPSSSSLSSANASASTNSEVRCETVRKSGI IKSFSERMYQWSIPP | 85 |
| <i>C.g-MMP-17</i> | ---ME-----TEREMYTQIGGACYCGHYTG--AAGGKAEGQAQTHRYGGRVP---RVSTMKTLMIIVIIYTQ----- | 59 |
| <i>A.s-MMP-17</i> | -----MVAGPSQCTSME-- | 12 |
| <i>P.h-MMP-17</i> | -----MRLLLAIPLLLFLSPAFCCLHPQ | 23 |
| <i>P.s-MMP-17</i> | MDAGKLEWLAESQQQQTQLLQLAEQQREQLRHQQKQMDQWMQGGPGGTGPPDTDSRRPGDRGRCSVTTALANVFLAPGLLNLGAIF | 90 |
| | | |
| <i>P.m-MMP-17</i> | PRALLVTILLCMYGDYVYQGAQIEGEAMKYLSHFHLYPKASREQ-ENLLHGENIKEAIKNLQRMENIPVTGKVDERTRLMHKKRCGVAD | 174 |
| <i>C.g-MMP-17</i> | --LLMINSVIGMPARDVS--MLEGDAVKFLAEFGYISQRQVEQGAQSLMAVDISKAIKKLQRMGGITPTGVLDIRITQELMHKPRCGNKD | 144 |
| <i>A.s-MMP-17</i> | -----AAAWEDWLTREGLPPDPVPT--GQLQTQEELTKAITAMQFQGLEATGILDEATLELMKTTPRCSLDP | 78 |
| <i>P.h-MMP-17</i> | ELPRTAEFWTNCSRVEDGMALGLAISPDVWTKFGLPPDPVPT--GQLQTQEELTKAITAMQRFQGLEATGVLDEATLELMKTTPRCSLDP | 112 |
| <i>P.s-MMP-17</i> | KQREKAAQAI FRIVIMCYRTKMNQPEKRDWLTKEGVLPPDPVPT--GQLQTQEELAKAIMAMQEFQGLEATGILDEATLELMKTTPRCSLDP | 179 |
| | | |
| | . : * * * : . . : : * * * * : * : * : * * : * * * : * * * * | |
| <i>P.m-MMP-17</i> | PVDELFGTGRGRRRKRKYVLAPTKWKKYDLYRIILNYTP--DLPVYVVRKALLDAFQVWSTVTKLTFTESMHGADIMIQFASGYHKDGY | 262 |
| <i>C.g-MMP-17</i> | TVEEEG----SRRKRYVLAQSKWNHKDLTYRIENYTP--DLPWQEVRRVLADAFKVVSDVLDLTFTEVMHTSADIMIKKASKYHKDGY | 226 |
| <i>A.s-MMP-17</i> | LAESEA----RRKRYAQAVTKWNRNLSWVRVTFPKESQLGHDTVRALMYYLKVVSDITPLNFHEVAGNADIQDFSKADHNDGY | 161 |
| <i>P.h-MMP-17</i> | LTTEET----RRKRFQAVTKWRKRNLSWVRVTFPKESHVGHDTVRALMYYLKVVSDITPLNFHEVAGNADIQDFSKADHNDGY | 195 |
| <i>P.s-MMP-17</i> | LAESET----RRKRYAQAMTKWNRNLSWVRVTFPRESHVGHDTVRALMYYLKVVSDITPLNFHEVAGNADIQDFSKADHNDGY | 262 |

列, 使用 NCBI 数据库的在线软件 Blastx 进行比对分析, 结果显示 *Pm-MMP-17* 与 *Cg-MMP-17* 的覆盖度和相似性最高, 分别为 82% 和 59%, 其序列与脊椎动物的一致性较低, 如密西西比鳄 (41%)、地山雀 (41%)、中华鳖 (39%)。

使用 DNAMAN 软件将马氏珠母贝、长牡蛎 (*C. gigas*, EKC39793. 1)、扬子鳄 (*Alligator sinensis*, XP_006017137. 1)、地山雀 (*Pseudopodoces humilis*, XP_005524601. 1)、中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*, XP_006117458. 1) 的 MMP-17 氨基酸序列进行多序列比对分析, 结果显示不同物种间 MMP-17 的氨基酸序列在催化区具有较高的保守性 (图 5)。

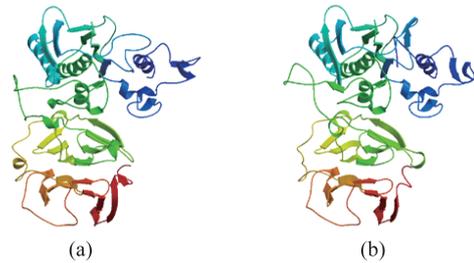
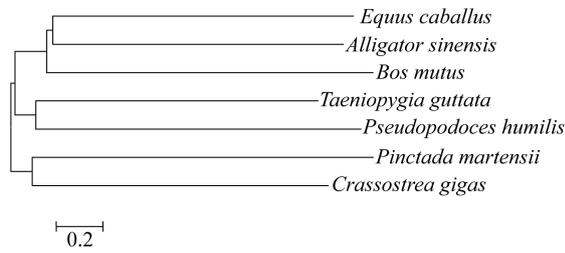


图 4 MMP-17 蛋白分子的空间结构

(a) Pm-MMP-17 SWISS-MODEL 预测; (b) Cg-MMP-17 SWISS-MODEL 预测

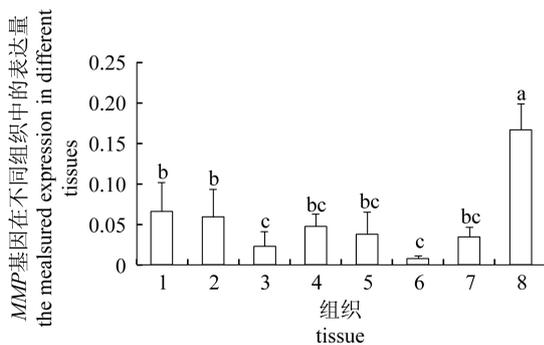
Fig.4 The spatial structure of MMP-17 proteins

(a) The spatial structure of Pm-MMP-17 predicted by SWISS-MODEL; (b) The spatial structure of *C. g-MMP-17* predicted by SWISS-MODEL

图 6 *Pm-MMP-17* 蛋白质聚类分析Fig. 6 Cluster analysis of *Pm-MMP-17* protein

2.5 *Pm-MMP-17* 基因在不同组织中的表达分析

通过荧光定量 PCR 的方法检测 *Pm-MMP-17* 在马氏珠母贝闭壳肌、鳃、珍珠囊、外套膜、肝胰脏、性腺、足、血淋巴 8 个组织中的表达情况,结果显示,其在血液中的表达量最高,其次是闭壳肌和鳃(图 7)。

图 7 *Pm-MMP-17* 基因在马氏珠母贝不同组织中的表达量

1. 闭壳肌; 2. 鳃; 3. 珍珠囊; 4. 外套膜; 5. 肝胰脏; 6. 性腺; 7. 足; 8. 血液

Fig. 7 Expression analysis of *Pm-MMP-17* gene in different tissues

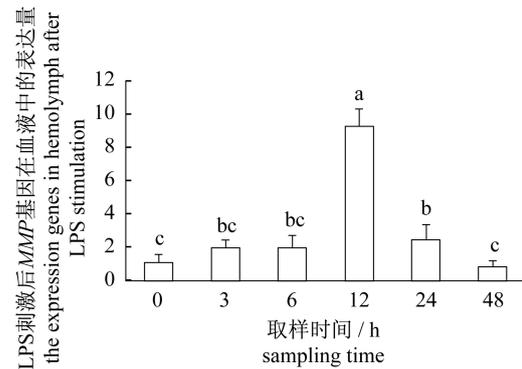
1. adductor muscle; 2. gills; 3. pearl sac; 4. mantle; 5. hepatopancreas; 6. gonads; 7. foot; 8. hemolymph

2.6 LPS 刺激下 *Pm-MMP-17* 在血液中的相对表达

在 LPS 刺激后,马氏珠母贝血液中 *Pm-MMP-17* 的表达量出现明显的变化。在注射后 12 h 表达量达到最大值,随后开始下降,在 24 ~ 48 h 基本恢复到正常水平,总体表现为先升高后降低的趋势(图 8)。

3 讨论

根据马氏珠母贝珍珠囊转录组数据库中注释

图 8 LPS 刺激后 *Pm-MMP-17* 基因在马氏珠母贝血液中的表达情况Fig. 8 Expression analysis of *Pm-MMP-17* gene in the hemolymph of *P. martensii* after LPS stimulation

为 *MMP* 基因的 unigene,设计基因特异性引物并运用 RACE 技术获得其 cDNA 序列,并对其序列特征及功能进行初步分析。*Pm-MMP-17* 具有 *MMPs* 家族特有的结构域:N-末端的信号肽、前导区、催化区、铰链区和 C-末端的类血红素结合蛋白区。其中,前肽区 KRCGVAD 序列中的 C 是一个“半胱氨酸开关”,在酶原激活的过程中被水解,使得酶原被激活;催化区上有高度保守的 HEXGHXXGXXH 序列,主要作为其催化中心。催化区上的 3 个组氨酸残基,能够与 Zn^{2+} 特异性结合,同时甲硫氨酸残基会形成转角,保护 Zn^{2+} ;除此之外,催化区上还有一个 TIMP 的位点;TIMP 为天然金属蛋白酶抑制物,在调控 *MMPs* 的活性方面起重要作用^[14]。TIMP 通过与 *MMP-17* 上的 TIMP 结合位点相结合,使得 *MMP-17* 的结构和功能发生变化,最终被抑制,从而有利于 ECM 的动态平衡。抑制作用主要表现在两个方面:一是阻止 *MMP* 酶原的活化,二是抑制已活化的 *MMP* 的活性^[15]; *MMP-17* 中的类血红素结合蛋白区是一个调节亚单位,有 4 个重复序列,推测其可能与 *MMPs* 底物特异性有关^[3]。

对基因进行组织定量是研究基因功能的一种重要手段。为了进一步探索 *Pm-MMP-17* 在马氏珠母贝中的生物学功能,我们通过荧光定量 PCR 对 *Pm-MMP-17* 基因在马氏珠母贝不同组织进行定量分析,结果显示 *Pm-MMP-17* 基因在血液中的表达量最高。*MMP-17* 是一种 MT-*MMP*,锚定在细胞膜上,并在细胞表面活动,参与调节细胞的迁移、生长、分化和存活^[1,8,16]。研究表明,*MMP-17* 在人嗜酸性粒细胞中有较高的表达水平,通过

降解 ECM 促进嗜酸性粒细胞的迁移和组织修复^[7,17]。由于贝类免疫系统属于非特异性免疫,具有开放式循环系统,细胞免疫是其主要的免疫防御机制之一^[18]。在受到外界抗原物质刺激时,血细胞首先要向外源物质迁移,我们推测 *Pm-MMP-17* 基因在马氏珠母贝血液中的高表达,有利于血细胞在贝体内的迁移。此外,从组织定量的结果上,还可以看出马氏珠母贝外套膜具有较高的 *Pm-MMP-17* 表达水平。通常来说,软体动物外套膜通过分泌有机基质(主要为多糖和蛋白)参与贝壳的形成,是贝壳形成的主要器官。另外,外套膜高表达的纤连蛋白、胶原蛋白也在贝壳中出现,虽然有机基质含量在贝壳的占额不足 5%,但是在 CaCO_3 晶体的核化、构象、晶体生长调控中起重要作用^[15,19-20]。马氏珠母贝外套膜分泌的 *Pm-MMP-17* 有可能通过调控有机基质的动态平衡而参与调控贝壳的形成,但这仍需进一步的实验验证。

鉴于 MMPs 在高等生物炎症反应中的重要作用,推测 *Pm-MMP-17* 可以参与贝体的免疫反应。LPS 是一种脂质和多糖的复合物,为革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分,经常被用来诱导有机体的免疫反应^[18,21]。研究证实,LPS 能够诱导马氏珠母贝肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (*TRAF6*)^[18]、紫色酸性磷酸酶 (*PAP*)^[22] 和白介素 17 (*IL-17*)^[23] 的高度表达,诱导马氏珠母贝的免疫反应。在 LPS 刺激后,马氏珠母贝血液中 *Pm-MMP-17* 基因的表达量在注射后 12 h 达到峰值,随后在 24 ~ 48 h 恢复到正常水平,说明 LPS 能够引起马氏珠母贝血细胞 *Pm-MMP-17* 的快速反应,也进一步说明了 *Pm-MMP-17* 对马氏珠母贝的免疫应答的重要性。

参考文献:

- [1] Paye A, Truong A, Yip C, *et al.* EGFR activation and signaling in cancer cells are enhanced by the membrane-bound metalloprotease MT4-MMP [J]. *Cancer Research*, 2014, 74 (23) : 6758 - 6770.
- [2] Vargova V, Pytliak M, Mechirova V. Matrix metalloproteinases [J]. *EXS*, 2012, 103 (1) : 1 - 33.
- [3] Olszynski K, Zimowska M. Structure and function of matrix metalloproteinases [J]. *Postepy Biochemii*, 2009, 55 (1) : 76 - 84.
- [4] Furumoto S, Takashima K, Kubota K, *et al.* Tumor detection using 18F-labeled matrix metalloproteinase-2 inhibitor [J]. *Nuclear Medicine and Biology*, 2003, 30 (2) : 119-125.
- [5] Pytliak M, Vargova V, Mechirova V. Matrix metalloproteinases and their role in oncogenesis: A review [J]. *Onkologie*, 2012, 35 (1 - 2) : 49 - 53.
- [6] Marco M, Fortin C, Fulop T. Membrane-type matrix metalloproteinases: Key mediators of leukocyte function [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2013, 94 (2) : 237 - 246.
- [7] Puente X S, Pendas A M, Llano E, *et al.* Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma [J]. *Cancer Research*, 1996, 56 (5) : 944 - 949.
- [8] Itoh Y, Kajita M, Kinoh H, *et al.* Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (48) : 34260 - 34266.
- [9] Wang Y, Yu S J, Li Y X, *et al.* Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-17 and -25 in gastric cancer [J]. *Oncology Letters*, 2015, 9 (2) : 671 - 676.
- [10] Rikimaru A, Komori K, Sakamoto T, *et al.* Establishment of an MT4-MMP-deficient mouse strain representing an efficient tracking system for MT4-MMP/MMP-17 expression *in vivo* using beta-galactosidase [J]. *Genes to Cells*, 2007, 12 (9) : 1091 - 1100.
- [11] Srichai M B, Colleta H, Gewin L, *et al.* Membrane-type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) modulates water homeostasis in mice [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (2) : e17099.
- [12] English W R, Puente X S, Freije J M, *et al.* Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (19) : 14046 - 14055.
- [13] Zhao X, Wang Q, Jiao Y, *et al.* Identification of genes potentially related to biomineralization and immunity by transcriptome analysis of pearl sac in pearl oyster *Pinctada martensii* [J]. *Mar Biotechnol (NY)*, 2012, 14 (6) : 730 - 739.
- [14] Nagel H, Laskawi R, Wahlers A, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1, -2, and -3 in benign and malignant tumours of the salivary gland [J].

- Histopathology,2004,44(3):222-231.
- [15] Jiao Y, Wang H, Du X, *et al.* Dermatopontin, a shell matrix protein gene from pearl oyster *Pinctada martensii*, participates in nacre formation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 425 (3): 679-683.
- [16] Leigh N R, Schupp M O, Li K, *et al.* Mmp17b is essential for proper neural crest cell migration *in vivo* [J]. PLoS One, 2013, 8(10):e76484.
- [17] Gauthier M C, Racine C, Ferland C, *et al.* Expression of membrane type-4 matrix metalloproteinase (metalloproteinase-17) by human eosinophils [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 35(12):1667-1673.
- [18] Jiao Y, Tian Q L, Du XD, *et al.* Molecular characterization of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) in pearl oyster *Pinctada martensii* [J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(4):10545-10555.
- [19] Latire T, Legendre F, Bigot N, *et al.* Shell extracts from the marine bivalve *Pecten maximus* regulate the synthesis of extracellular matrix in primary cultured human skin fibroblasts [J]. PLoS One, 2014, 9(6):e99931.
- [20] Zhang G, Fang X, Guo X, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation [J]. Nature, 2012, 490(7418):49-54.
- [21] Hughes T J, Smith E M, Barnett J A, *et al.* LPS stimulated invertebrate hemocytes: A role for immunoreactive TNF and IL-1 [J]. Developmental and Comparative Immunology, 1991, 15(3):117-122.
- [22] Wang Q H, Jiao Y, Du XD, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of purple acid phosphatase gene from pearl oyster *Pinctada martensii* [J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(1):552-562.
- [23] Wu S Z, Huang X D, Li Q, *et al.* Interleukin-17 in pearl oyster (*Pinctada fucata*): Molecular cloning and functional characterization [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2013, 34(5):1050-1056.

Molecular cloning and expression analysis of matrix metalloproteinase 17 gene from *Pinctada martensii*

LUO Shaojie¹, YAN Fang¹, ZHENG Zhe¹, TIAN Rongrong¹, DENG Yuewen^{1,2}, JIAO Yu^{1*}

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Guangdong Technology Research Center for Pearl Aquaculture and Process, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: Matrix metalloproteinases (MMPs) could degrade the extracellular matrix and participate in various physiological processes, such as homeostasis and immune response. MMP-17 is one membrane type MMP that attaches to the cell surface by Glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI), and participates in various physiological processes, such as organic homeostasis and immune defense. The pearl oyster *Pinctada martensii* is the main species cultured for marine pearl production in China. To deliberate the function of MMP-17 in the immune response of *P. martensii*, in this study, using rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology, we have obtained the full length sequence of *Pinctada martensii* MMP (*Pm-MMP-17*) cDNA and analyzed its sequence characteristics and function. Our results showed that the cDNA full length of *Pm-MMP-17* is 2 794 bp, including 156 bp of 5'UTR, 715 bp of 3'UTR, and 1 923 bp of open reading frame (ORF) encoding 640 amino acid residues with an estimated molecular mass of 73.11 ku and theoretical isoelectric point of 8.98. Multi-sequence alignment and phylogenetic analysis results showed that *Pm-MMP-17* was highly homologous with that from other species and had 82% sequence identity with *Crassostrea gigas* MMP-17. Amino acid sequence analysis showed *Pm-MMP-17* had five conservative domains: signal peptide, propeptide, catalytic domain, hinge region and hemopexin-like domain. Meanwhile, real-time PCR analysis showed that *Pm-MMP-17* was ubiquitously expressed in all tissues detected, including adductor muscle, pearl sac, foot, mantle, hemolymph, hepatopancreas, gonads and gills, with the highest expression level in hemolymph, followed by adductor muscle and gill. Previous research has showed that *Pm-MMP-17* was highly expressed in the eosinophils and involved in the regulation of cell migration, growth and differentiation. We supposed that the highly expression of *Pm-MMP-17* gene in the hemolymph was crucial for the migration of hemolymph in the body of pearl oyster. After LPS stimulation, the expression level of *Pm-MMP-17* began to increase and reached the highest level at 12 h, and then gradually declined to the normal level ($P < 0.05$), indicating again the important function of *Pm-MMP-17* gene in the immune response of pearl oyster *P. martensii*. Therefore, our data showed *Pm-MMP-17* participated in the immune response in *P. martensii* and provided the basis for further research in the mechanism underlying the immune defense in pearl oyster.

Key words: *Pinctada martensii*; *Pm-MMP-17* gene; cloning; real-time PCR; expression analysis

Corresponding author: JIAO Yu. E-mail: jiaoyu1981@hotmail.com