

三角帆蚌钙网蛋白基因 cDNA 的分子特征与表达分析

夏秀琳^{1,2}, 汪桂玲^{1*}, 白志毅¹, 李家乐^{1,2}

(1. 上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海市高校水产养殖学 E 研究院, 上海海洋大学, 上海 201306)

摘要: 为研究淡水珍珠形成相关基因及调控机理, 以三角帆蚌为研究对象, 借助 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术获得了三角帆蚌的钙网蛋白基因(calreticulin, HcCRT) cDNA 序列, 该序列长 1 437 bp, 包含 231 bp 的 5'非编码区(untranslated region, UTR)和 615 bp 3'UTR 以及 591 bp 的开放阅读框(ORF), 共编码 196 个氨基酸残基, 包含一段由 21 个氨基酸组成的信号肽和一段由 175 个氨基酸的成熟肽, 分子量约为 22.4 ku, 理论等电点 5.01。氨基酸序列分析表明, 该序列不存在跨膜结构, 疏水性分析显示该蛋白整体为亲水性蛋白。氨基酸序列比对分析显示, HcCRT 具有保守的钙网蛋白家族结构, 具有 2 个保守的钙网蛋白家族标签序列: KHEQNIDCGGGYLKVF 和 IMFGPDICG, 与其他已知物种的 CRT 具有较高保守性, 其中与斑马鱼的相似度为 77%, 与长牡蛎和马氏珠母贝的相似度为 70%。对三角帆蚌 HcCRT 蛋白序列的二级结构和三级结构进行预测分析, 显示该蛋白同时含螺旋和折叠。实时荧光定量 PCR 分析结果显示, HcCRT 在外套膜、血液、鳃、斧足、肝脏、肾脏、肠和闭壳肌等 8 个组织中均有表达, 其中在外套膜中表达量最高, 血液次之, 在其他组织的表达量极少。初步推测 HcCRT 参与了三角帆蚌珍珠形成的生物矿化过程。

关键词: 三角帆蚌; 钙网蛋白; 分子特征; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

钙网蛋白(calreticulin, CRT)是由单一基因编码, 具有多种重要生物功能的高度保守的钙结合蛋白, 如参与调节细胞凋亡, 协助蛋白质正确折叠, 维持细胞 Ca^{2+} 稳态和自身免疫反应等^[1-2]。最初研究认为, 钙网蛋白是内质网和肌质网特有的蛋白^[3-4], 后期研究发现在细胞表面、血液和细胞外基质等中也有大量钙网蛋白的存在^[5-7]。目前研究所发现的钙网蛋白一般均具有 2 个保守的钙网蛋白家族标签识别序列 KHEQNIDCGGGYLKVF 和 IMFGPDICG, C-末端具有低亲和力、高容量的钙结合位点, 有很强的与钙结合的能力, 通常含有作为内质网滞留信号的四肽序列 H/KDEL。至今已在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[8]、中国明对虾

(*Fenneropenaeus chinensis*)^[9]、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[10]、马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)^[11]和加利福尼亚海兔(*Aplysia*)^[12]等物种中获得 CRT 序列, 并对其分子结构及相关功能进行了研究。Balakier 等^[13]研究表明, 钙网蛋白在人类的早期胚胎发育中对 Ca^{2+} 的短暂细微调节发挥关键作用。Zhang 等^[14]研究表明, 钙网蛋白参与了猪卵母细胞和胚胎发育过程中 Ca^{2+} 的动态平衡调节。Somogyi 等^[7]研究发现, 钙网蛋白在哺乳类牙齿的矿化形成中可以转运钙离子。

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)属瓣鳃纲(Lamellibranchia)蚌目(Unionoida)蚌科(Unionidae)帆蚌属(*Hyriopsis*), 是中国特有的重要优良淡水育珠蚌^[15]。近年来随着珍珠养殖面

收稿日期:2012-11-26 修回日期:2013-02-08

资助项目:国家自然科学基金项目(31101939);上海市科委基础研究重点项目(10JC1406300);上海市教委科研创新重点项目(13ZZ128);上海市高校知识服务平台项目(ZF1206)

通信作者:汪桂玲, E-mail: glwang@shou.edu.cn

积的扩大,在病害防治、资源保护等方面也出现了一些问题,导致产生的珍珠产量与质量都受到了影响,因此对于三角帆蚌的成珠相关基因方面研究具有重要意义。三角帆蚌外壳和珍珠都是生物矿化的产物,主要由 CaCO_3 组成,因此 Ca^{2+} 是生物矿化的重要成分,在形成的过程当中, Ca^{2+} 的吸收、转运和贮存到许多因素的影响。珍珠贝从外界水环境中吸收矿化所需的 Ca^{2+} ,以离子扩散、离子通道、与钙结合蛋白结合等形式^[16],经过血液运输到矿化部位^[17]。钙网蛋白是重要的钙结合蛋白,已发现其参与骨骼、牙齿的形成等生物矿化过程。Fan 等^[11]在海水贝类马氏珠母贝中用组织表达分析发现,CRT 在外套膜中,血液中具有高表达,参与钙的贮存与运输,参与马氏珠母贝的生物矿化过程。但钙结合蛋白在贝类的生物矿化中的具体作用还有待深入研究。

目前淡水蚌珍珠形成相关基因的研究刚刚起步,钙网蛋白相关的研究还未见报道。在本研究中,利用 RACE 技术获得了三角帆蚌的钙网蛋白 *HcCRT* 基因的 cDNA 序列,对基因的结构和相应的氨基酸序列进行了分子特征分析,并对 *HcCRT* 基因所编码蛋白质的二级结构和三级结构进行了分析预测。利用荧光定量 PCR 技术对 *HcCRT* 基因在三角帆蚌各组织表达情况进行了检测分析,初步研究钙网蛋白在三角帆蚌的珍珠形成中的作用,为后续研究三角帆蚌珍珠形成基因的调控奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

三角帆蚌采自浙江省金华市威望养殖新技术有限公司生产基地,健康的 3 龄蚌,置于玻璃缸 (50 cm × 30 cm × 35 cm) 中,投喂小球藻暂养一周,用于 *HcCRT* 基因 cDNA 的克隆。随机选取重约 100 g 的三角帆蚌进行组织定量表达实验。分别提取三角帆蚌的外套膜、血液、鳃、斧足、肝脏、肾脏、肠和闭壳肌等 8 个组织用于组织表达检测实验。

1.2 实验方法

三角帆蚌外套膜总 RNA 提取 RNA 提取采用 RNAisoTM Plus (TaKaRa, 大连) 试剂。活体解剖,取三角帆蚌外套膜组织 100 mg 左右于 1.5 mL 离心管中,加入 1.0 mL RNAiso Plus 试剂,经

匀浆、氯仿抽提、异丙醇沉淀、75% 酒精清洗,用适量 0.01% DEPC 处理过的水溶解总 RNA^[18]。用 Nanodrop ND-2000 C 分光光度计测量 RNA 浓度及纯度,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。

***HcCRT* 基因 cDNA 的片段扩增、克隆和序列测定** 使用 PrimerScript cDNA 第一链合成试剂盒 (TaKaRa, 大连),以外套膜总 RNA 为模板,采用 adapter-T 合成 cDNA 第一链,合成方法参照试剂盒说明书。根据小鼠 (*Mus musculus*),斑马鱼 (*Danio rerio*) 等物种的 CRT 基因 cDNA 保守区设计引物 F1、R1,以 cDNA 为模板进行中间片段的扩增。PCR 反应试剂采用 Ex Taq 酶 (TaKaRa, 大连),扩增体系包括 TaKaRa Ex Taq (5 U/μL) 0.125 μL; 10 × Ex Taq Buffer (Mg^{2+} plus) 2.5 μL; dNTP mixture (各 2.5 mmol/L) 2 μL; 上下游引物各 0.5 μL (20 μm/L); cDNA 模板 2 μL 及双蒸水 17.375 μL。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测,扩增产物送往上海迈普生物技术有限公司测序。

以获得的三角帆蚌外套膜的 *HcCRT* 的片段序列为模板,用 Primer Premier 5.0 软件并结合 BLAST 程序设计特异性引物用于 3' 和 5' 末端扩增,引物均由生工生物技术 (上海) 有限公司合成 (表 1)。采用 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 试剂盒 (TaKaRa, 大连) 进行 3' 端扩增,方法参照使用说明。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 获得特异性 PCR 产物。采用 SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 美国) 进行 5' 端扩增,方法参照使用说明。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 30 s; 72 °C 3 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 3 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C, 3 min, 27 个循环。

3' 和 5' RACE 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,经 TIANgel Midi Purification Kit [天根生化科技 (北京) 有限公司] 回收目的片段 PCR 产物,纯化后的 PCR 产物与 pMD19-T (TaKaRa, 大连) 载体连接 16 h, 转化到感受态细胞 *E. coli* DH5α, 经 LB 平板 (含 Amp⁺、IPTG 和 X-gal) 37

℃培养后,蓝白斑筛选阳性克隆,进行插入片段检测,挑选含有目的片段的阳性克隆送往上海迈普生物技术有限公司进行序列测定。

生物信息学分析 通过 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 数据库搜索,分析核苷酸序列、氨基酸序列的相似性。ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 确定正确的开放阅读框 (open reading frame, ORF)。用 ProtParam 程序分析氨基酸序列

的物理参数;Signal P 3.0 server 预测氨基酸序列的信号肽;TMHMM 软件预测分析氨基酸跨膜结构;ProtScale 软件预测氨基酸序列的疏水区。多序列比对时,用 CLUSTALW 1.83 软件进行分析。Jpred3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/index.html>) 预测蛋白质的二级结构,利用 ESyPred3D (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioin/esypred/>) 将序列提交后,进行蛋白质三级结构预测分析。

表 1 本实验中用到的引物
Tab.1 Primer sequences used in this study

引物 primer	引物序列 (5'-3') primer sequence	用途 usage
CRT-F	CTGCCATCTATTTCAAAGAG	中间片段扩增
CRT-R	GTAGGAGGTTCTCGGAC	fragment amplification
CRT-GSP for 5'race	GCGACCACCCACGACTATTTTGTGAACT	5'race 引物
5'race-UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	5'race 通用引物
CRT-GSP for 3'race	CCCGCAATCTGACTAACACT	3'race 引物
3'race-Primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT	3'race 通用引物
CRT-qRT-F	CGGCTTCAAGGATTGGTCA	荧光定量引物
CRT-qRT-R	GCGTCTCCTTCATTGGCAG	primers for q PCR
β -actin-F	ACGGATAACACAAGGAAAGGAAAC	内参基因
β -actin-R	ATGGATGGAAACACGGCTCT	housekeeping gene primers

HcCRT 基因组织表达检测 运用实时荧光定量 PCR 技术检测 HcCRT 基因在三角帆蚌的各组织中的分布情况。采用 RNAiso™ Plus (TaKaRa, 大连) 试剂,分别从三角帆蚌外套膜、血液、鳃、斧足、肝脏、肾脏、肠和闭壳肌 8 个组织提取总 RNA。经 PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa, 大连) 反转录合成单链 cDNA。

根据三角帆蚌 HcCRT 基因保守序列设计引物 CRT-qRT-F、CRT-qRT-R, 并采用 β -actin 作为内参基因 (表 1)。实时荧光定量 PCR 采用 SYBR premix Ex Taq™ 试剂盒 (TaKaRa, 大连) 在 Bio-Rad CFX-96 (Bio-Rad, 美国) 实时荧光定量 PCR 仪上进行。PCR 反应采用 20 μ L 反应体系, 包括 Premix Ex Taq™ (2 \times) 10.0 μ L、上下游引物 (10 mol/L) 各 0.4 μ L、ddH₂O 8.2 μ L 及模板 cDNA 1.0 μ L。其中每个样品的目的基因和相应的内参基因分别进行 3 次重复。反应程序如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 40 个循环; 65 ~ 95 $^{\circ}$ C 获得溶解曲线。对经准确定量的 cDNA 模板进

行 6 个梯度的稀释, 每个梯度以 10 为单位, 用于制作目的基因与内参基因的标准曲线。相对表达量数据通过公式 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算。采用 SigmaPlot1 2.0 软件绘制矩形图。应用 SPSS 19.0 软件进行显著性分析, 采用单因素方差分析的 Dunnett's T3 检测方法, 当 P 值小于 0.05 时认为具有显著性差异。数据以平均值 \pm 标准误差 (mean \pm SE) 表示。

2 结果

2.1 HcCRT 基因的克隆和氨基酸序列特征分析

本次获得的三角帆蚌 HcCRT 的 cDNA 长 1 437 bp, 其中开放阅读框为 591 bp, 编码 196 个氨基酸残基。在第一个起始密码子 ATG 的上游有长为 231 bp 的 5' UTR, 在终止密码子的下游有长 616 bp 的 3' UTR。3' UTR 区含有典型的多聚腺苷酸加尾信号序列 AATAA 和 PolyA 尾巴 (图 1)。

根据三角帆蚌 HcCRT 基因 cDNA 推测得到的 196 个氨基酸, 分子式为 C₁₀₀₆H₁₅₃₈N₂₇₂O₂₉₉S₇, 分子量约为 22.4 ku, 理论等电点为 5.01, 不稳定系数为

43.91,表明此蛋白质的性质不稳定。利用 Signal P 3.0 server 在线程序预测 N-端有 21 个氨基酸序列的信号肽,序列为 MASSRRRIFQMSAIYFKEHFLD。C-端富含谷氨酸(E)和天门冬氨酸(D)。TMHMM 分析表明,该序列无明显的跨膜区。ProtScale 在线分析亲水性/疏水性,指数为该序列大部分氨基酸属于亲水性氨基酸,氨基酸序列属亲水蛋白。

结合 BLAST 分析结果,利用 CLUSTAL 1.83 软件将 *HcCRT* 基因预测的氨基酸残基序列与长牡蛎 (*Crassostrea gigas*, *CgCRT*, BAF63639.1), 马氏珠母贝 (*Pinctada fucata*, *PfCRT*, ABR68546.1), 斑节对虾 (*Penaeus monodon*, *PmCRT*,

ADQ28317.1) 中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*, *FcCRT*, ABC50166.1) 和斑马鱼 CRT (*Danio rerio*, *DrCRT*, NP-956007.1) 进行比对,与上述已知物种的 CRT 家族具有极高保守性,其中与斑马鱼的相似度为 77%,与长牡蛎,马氏珠母贝的相似度为 70%。进行 NCBI BLAST 对比分析发现,*HcCRT* 基因具有保守的钙网蛋白家族结构(图 2-b),具有与钙结合的能力。*HcCRT* 基因与已发现的其他 CRT 均具有 2 个保守的钙网蛋白家族标签序列 KHEQNIDCGGGYLKVF 和 IMFGPDICG(图 2-a)。其中的 Cys 和 Cys 形成二硫键,可调节 CRT 与未折叠蛋白的结合能力。

```

acgcgggcatgtccaagtacatactttcacatggtaaacgcaatggctcattaaatcagttatggttccttagatcgtacaa      85
tctacttggataactgtgcaattctagagctaatacatggaacacagctccgaccttcgggaagagcgtttttattagttcca    170
aaaccaatccggccgagggccggttccgctggtgaatctgaataactttgtgccgatcgc                          231
ATGGCCTCGAGCCGGCGACGTATCTTCAAATGCTGCCATCTATTTCAAAGAGCATTCTTGGACGGAGATGCCTGGACC    312
M A S S R R R I F Q M S A I Y F K E H F L D G D A W T      27
AACCGCTGGGTGCAATCCAACATAAGTCCGATTTTGGCAAATTTGTCCTCAGTTCCTGGCAAATTTTACGGGGACCTGGAG  393
N R W V E S K H K S D F G K F V L S S G K F Y G D L E      54
AAGGATAAAGGGCTGCAGACAAGCAAGATGCCGATTTTACGCACTGTCGCCAAATTCGAACCCCTCAGCAATAAGGGC    474
K D K G L Q T S Q D A R F Y A L S A K F E P F S N K G      81
CAGACACTGGTGTACAGTTCACGGTGAAGCATGAGCAGAATATCGACTGTGGGGCGGCTACCTGAAGGTGTTTCCGAGT    555
Q T L V V Q F T V K H E Q N I D C G G G Y L K V F P S      108
GGTTTGGACCAGAAGGACATGCATGGAGACTCAGAATATAACATCATGTTTGGTCCGGACATCTGGCTCCTGGACCAAG  636
G L D Q K D M H G D S E Y N I M F G P D I C G P G T K      135
AAGGTTATGTCATCTTAACTACAAGGGCAAGAATGTGCTGATCAACAAGGATATCCGGTGAAGGATGATGAATTCACA    717
K V H V I F N Y K G K N V L I N K D I R C K D D E F T      162
CACCTATACACTGATTGTGCGCCAGACAACACCTATGAGGTGAAAATTGACAACAGCCAGGTGGAGTCAGGCTCCTTG    798
H L Y T L I V R P D N T Y E V K I D N S Q V E S G S L      189
GAGGATGCGCGGATCCTCCACTAG                                822
E D A R I L H *                                           196
tgatttactataggtcttttttaaatgtcatgtaaatgctttaattctttcacaagaaaaaaaaaacctttggaaggactg    907
taggtttgttaatccaacaagcaatacctgactggcatttcagtcagactatgggtacgttttacagacaacgatatgcttaa  992
aacggagaagtttcccttgagttttccgctacagacgacagaccattgtccaactatacgaatccgtaaaaatgactaaaa  1077
acgcttattctgctggcagccataagatggcgatgaaacgctatagattgaacatgtaacgcatgtgcatgacgtcatcgtt  1162
ttcacagattcgcgtttttgttttacagcgtatccgtttttagcaccacaaaacgctgtgtcatgtaaatgaacgcaaaa  1247
cgcattaaaagatttacgtttttagttgaaaacagtgctgtgtaaacagcccattttattcaacaaggatgcattattgatcaa  1332
aagtacagtaaaactaataatgttccaaaagatttctgtttcattttaaagctgttctattcaactttccattcatcaaga  1417
atcctgaaaaaaaaaaaaaa                                     1437

```

图 1 三角帆蚌 *HcCRT* 基因的 cDNA 序列及预测的氨基酸序列

小写字母分别代表 5',3'非编码区序列,大写字母代表编码区序列,上面为核苷酸序列,对应下面为编码的氨基酸序列;斜体 ATG 表示起始密码子,*表示终止密码子,框内斜体的氨基酸表示的信号肽序列,框线内灰色阴影表示的是钙网蛋白家族的标签序列,框线内“aataa”为多聚腺苷酸加尾信号。

Fig.1 *HcCRT* cDNA sequence and predicted amino acid sequence

Sequences of 3',5'untranslated regions are shown as lowercases; Coding region is shown as uppercases, where the upper sequence indicates the nucleotides and the lower shows the amino acids; Italics ATG is used to indicate the initiation codon; Stop codon is marked with asterisk (*); Italics amino acids in box represents the signal peptide; The two calreticulin family signature sequences are boxed with gray shaded; Putative polyadenylation signals(AATAAA)are boxed.

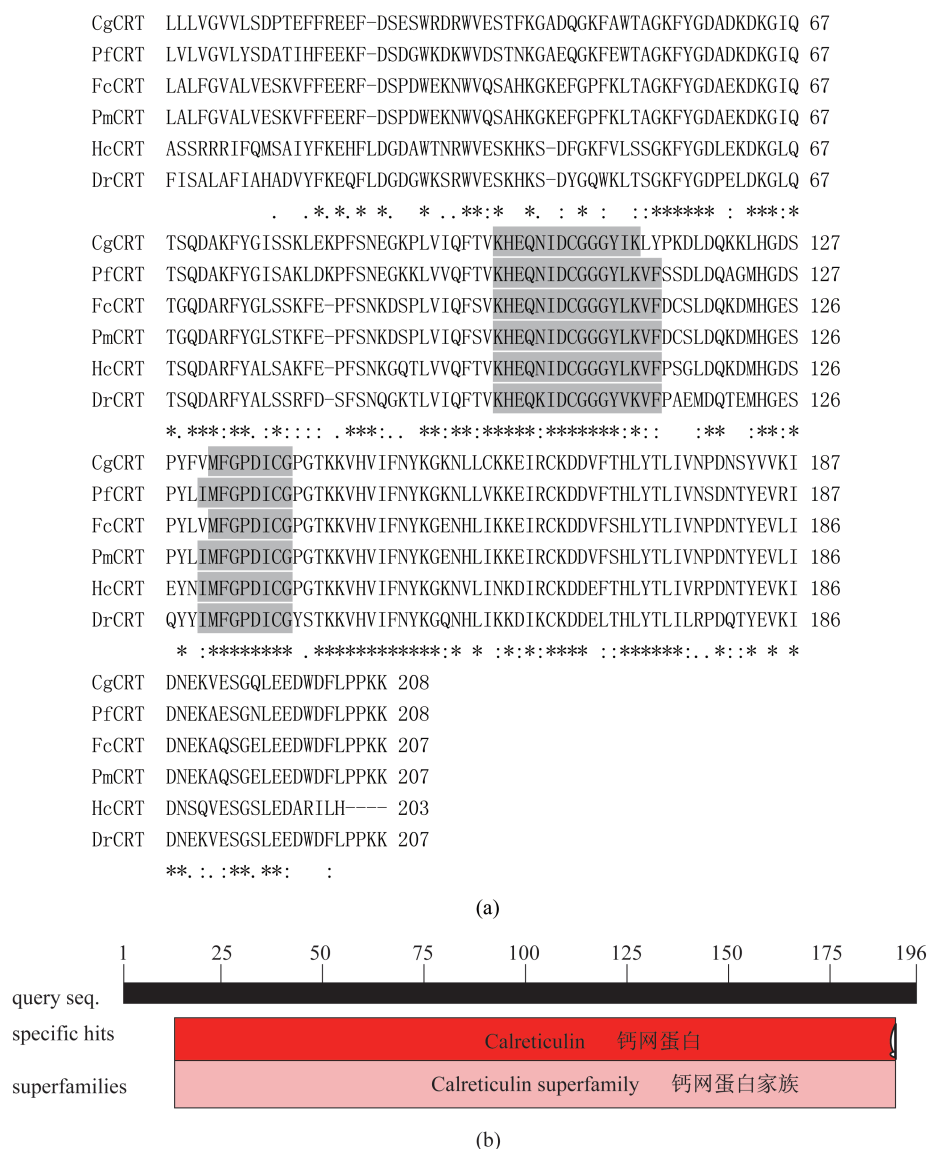


图2 CRT氨基酸序列对比及HcCRT中保守的钙网蛋白家族序列

(a) - 表示比较时氨基酸缺口, * 表示保守的氨基酸残基, : 表示保守替换的氨基酸残基, . 表示相似性氨基酸, 以灰色突出的部分表示两个保守的钙网蛋白家族标签序列。(b) 表示HcCRT中保守的钙网蛋白家族序列。

Fig. 2 CRT amino acid sequence compared and conservative sequence of calreticulin protein family in HcCRT

(a) - indicate the amino acid gaps which are necessary to align these sequences; * is used to indicate highly conserved amino acid residue; : indicate conservative amino acid residue which was replaced; . represents simily amino acid; The two calreticulin family signature sequences are gray shaded. (b) conservative sequeences in HcCRT.

2.2 HcCRT 蛋白结构预测

SignalP 程序中 NN 和 HMM 模型对三角帆蚌 HcCRT 基因所编码的氨基酸序列进行分析表明, 在序列 N-端存在由 21 个氨基酸组成的信号肽, 从第 22 到 196 个氨基酸为成熟肽。Jpred3 软件对三角帆蚌 HcCRT 基因编码蛋白的二级结构预测结果表明, 其二级结构同时包含螺旋和折叠, 在第 66 ~ 71 位氨基酸残基处存在 α 螺旋, 在第 14 ~ 19, 41 ~ 46, 57 ~ 63 以及第 174 ~ 179 位氨基酸残基处存在

β 折叠。以 Kozlov 等^[19]报道的小鼠的 Calreticulin Lectin Domain A 链三级结构 (PDB id:3o0V) 为模板, 通过 ESyPred3D 预测获得了三角帆蚌 HcCRT 蛋白的三级结构。三角帆蚌的 HcCRT 三级结构预测与家鼠的 CRT 三级结构相似度为 64.3%, 其模式见图 4 中 A 和 B。从图中可以看出, 蛋白质同时包含螺旋和折叠, 分为片层结构富集区和带有一个螺旋的长链区两个部分。HcCRT 蛋白基本上呈球形, 疏水基多聚在分子内部, 而亲水基多分布在分

子表面。

2.3 HcCRT 基因的组织表达分析

将目的基因 *HcCRT* 和内参基因 β -actin 的 cDNA 标准品以 10 为单位稀释 6 个梯度,制作标准曲线,结果显示两者的溶解曲线都属单一峰,PCR 扩增效率 E 值分别为 1.07 和 1.03,均接近 1.0 适合作为标准曲线。荧光定量检测 *HcCRT* 基因在各组织的表达情况,每个组织均以相应组织的 β -actin 为内参基因,相对表达量数据通过公式 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算,结果显示,三角帆蚌 *HcCRT* 基因在外套膜、血液、鳃、斧足、肝脏、肾脏、肠和闭壳肌中均有表达。其中外套膜中的 *HcCRT* 基因表达丰度最高,血液和斧足次之,鳃中表达水平相对较低,而在肝脏、肾、肠和闭壳肌表达量极低,几乎不表达。*HcCRT* 基因 mRNA 在组织表达中存在显著差异(图 4)。

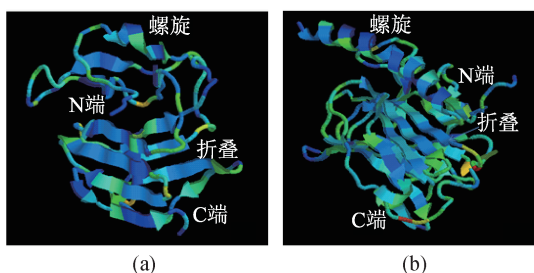


图 3 ESyPred3D 预测的三角帆蚌 *HcCRT* 蛋白(a)、模板(b)

Fig. 3 *HcCRT* (a), templet (b), protein tertiary structure by ESyPred3D

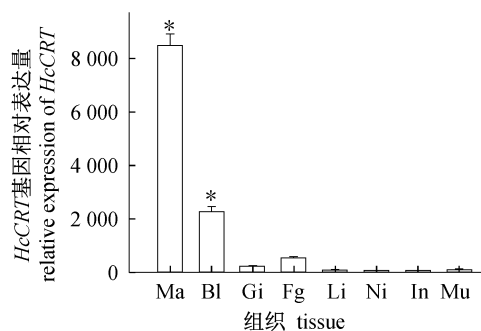


图 4 三角帆蚌 *HcCRT* 基因组织分布

以 β -actin 为内参基因,所显示的为相对定量数据为平均值 \pm 标准误, * $P < 0.05$ 。其中: Ma. 外套膜; Bl. 血液; Gi. 鳃; Fo. 斧足; Li. 肝脏; Ki. 肾; In. 肠; Mu. 闭壳肌。

Fig. 4 Expression of *HcCRT* in different *H. cumingii* tissues

The relative expression of the gene transcript from qRT-PCR analysis was calculated to the β -actin mRNA level. Data are given as plus or minus the standard error of the means (means \pm SE), * $P < 0.05$. Ma. mantle; Bl. blood; Gi. gill; Fo. liver; Ki. kidney; In. intestines; Mu. adductor muscle.

3 讨论

本实验以三角帆蚌为研究对象,通过短片段扩增,RACE 克隆获得了三角帆蚌的钙网蛋白基因 cDNA 序列 (*HcCRT*)。此次获得的三角帆蚌 *HcCRT* 的 cDNA 长 1 437 bp,其中开放阅读框长 591 bp,编码 196 个氨基酸残基,由一段 21 个氨基酸组成的信号肽和 171 个氨基酸的成熟肽组成。该氨基酸序列不存在跨膜结构,属亲水性蛋白。对三角帆蚌 *HcCRT* 基因编码蛋白的二级结构预测结果表明,其二级结构同时包含螺旋和折叠,三级结构预测结果与二级预测一致,同时含螺旋和折叠。进行 BLAST 对比分析发现,*HcCRT* 蛋白具有保守的钙网蛋白家族结构域,其中与斑马鱼的相似度为 77%,与长牡蛎、马氏珠母贝的相似度为 70%。*HcCRT* 基因与其他已知物种的 CRT 一样均含有 2 个 CRT 家族标签序列, KHEQNIDCGGGYLKVF 和 IMFGPDICG。表明此次克隆的 *HcCRT* 基因是为钙网蛋白家族基因。标签序列标签中的 Cys 和 Cys 形成二硫键,可调节 CRT 与未折叠蛋白的结合能力。此次克隆的三角帆蚌 *HcCRT* 蛋白 C-端富含谷氨酸(E)和天门冬氨酸(D)。

目前已研究的 CRT 序列 C-端通常具有内质网滞留信号的四肽序列 HDEL 或 KDEL^[9-11]。中国明对虾^[9]、马氏珠母贝^[11]等物种 CRT 序列中的内质网滞留信号的四肽序列是 HDEL,长牡蛎^[10]中 CRT 的内质网滞留信号的四肽序列则为 KDEL。而在蜷 (*Amblyomma americanum*)、十二指肠虫等中,研究发现保守的钙网蛋白的内质网滞留信号为 HEEL^[20-21]。另外研究发现部分物种的钙网蛋白无内质网滞留信号^[22]。这些蛋白分泌到内质网以外,如细胞表面,血液,细胞外基质等部位发挥特定作用^[5-7]。此次克隆的三角帆蚌 *HcCRT* 基因没有内质网滞留信号,存在于内质网以外的地方发挥作用。但对于带有不同的末端氨基酸定位信号序列的钙网蛋白及该定位序列在钙网蛋白定位中的作用有待更深入的研究。

组织表达分析表明,三角帆蚌 *HcCRT* 基因在外套膜、血液、鳃、斧足、肝脏、肾脏、肠和闭壳肌中均有表达,其中在外套膜中表达量最高,血液次之,而在其他组织表达极低。Fan 等^[11]利用半定量法检测马氏珠母贝中钙网蛋白 (*PfCRT*) 在各组织的表达情况,研究表明 *PfCRT* 在外套膜,血淋

巴,生殖腺,鳃,消化腺组织中均有表达,其中在外套膜,血淋巴中表达最高。本研究结果与在马氏珠母贝^[11]中的研究结果一致,均在外套膜和血中呈现高表达。外套膜在生物矿化中起着重要的作用,参与 Ca^{2+} 的转运,富集,分泌等^[23-24]。外套膜中内部的上皮细胞与水环境直接接触,具有从水中吸收 Ca^{2+} 的功能^[25],外套膜的中部是储存钙的重要部位^[26-27]。李文娟等^[28]利用激光共聚焦技术发现三角帆蚌的外套膜中 Ca^{2+} 荧光强度最大,育珠期外套膜细胞内 Ca^{2+} 荧光强度比非育珠期增强,差异达到显著水平,表明外套膜是从外界吸收和贮存 Ca^{2+} 的主要组织。*HcCRT* 基因在三角帆蚌外套膜中的高表达,表明 *HcCRT* 基因与 Ca^{2+} 吸收贮存有关,参与了三角帆蚌的生物矿化,但进一步的证明需要更深入的研究。血液属于流动系统,是一种重要的运输途径。生物矿化首先要将所需的钙,碳酸盐等集中到矿化部位,而血液则起着重要的运输作用^[17]。已有研究表明,钙的转运以多种形式进行,包括以钙离子形式、钙与蛋白结合的方式、无定形碳酸钙的形式^[16,29]。血液中的钙以何种形式转运目前还不明确。钙网蛋白是重要的钙结合蛋白之一。本研究中三角帆蚌 *HcCRT* 基因在血液中的表达量较高,*HcCRT* 蛋白参与了血液中钙的转运,结合大量的钙运往生物矿化的部位。进一步明确 *HcCRT* 蛋白在参与血液中钙的运输的具体作用还需进一步深入的研究。Fan 等^[11]利用半定量法检测发现马氏珠母贝中钙网蛋白(PCRT)外套膜,血淋巴中表达较高,原位杂交检测显示在外套膜内侧,中侧的内部,外侧的外部均有 *PfCRT* 信号显示,证明外套膜具有储存钙的功能。外套膜,鳃吸收生物矿化所需的钙,然后在利用血淋巴组织运输到生物矿化的位置^[17]。对于 *HcCRT* 蛋白在三角帆蚌珍珠形成中的作用,有待进一步研究。在贝类中,珍珠和贝壳都是贝类生物矿化的结果,都是在贝壳有机质的精确调控下有序地组织 CaCO_3 晶体相互作用形成。可以通过对贝壳进行损伤处理,观察在三角帆蚌贝壳修复过程中外套膜,血液等组织中 *HcCRT* 蛋白的变化及作用进而推测 *HcCRT* 蛋白在珍珠形成中的作用,以期对珍珠形成相关的研究和实际生产做出贡献。

本研究中获得了三角帆蚌的钙网蛋白 *HcCRT* 基因的 cDNA 序列,组织表达分析表明

HcCRT 基因在外套膜,血液中高表达,参与生物矿化。但其在外套膜,血液及在珍珠形成等生物矿化中的具体作用及调控机理有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Michalak M, Corbett E F, Mesaeli N, *et al.* Calreticulin, one protein, one gene, many functions [J]. *Biochemical Journal*, 1999, 344(2): 281 - 292.
- [2] Coppolino M G, Dedhar S. Calreticulin [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1998, 30(5): 553 - 558.
- [3] Ostwald T J, MacLerman D H. Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249(3): 974 - 979.
- [4] Michalak M, Mariani P, Opas M. Calreticulin, a multifunctional Ca^{2+} binding chaperone of the endoplasmic reticulum [J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 1998, 76(5): 779 - 785.
- [5] Arosa F A, Jesus O D, Porto G, *et al.* Calreticulin is expressed on the cell surface of activated human peripheral blood T lymphocytes in association with major histocompatibility complex class I molecules [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(24): 16917 - 16922.
- [6] Sueyoshi T, McMullen B A, Marnell L L, *et al.* A new procedure for the separation of protein Z, prothrombin fragment 1. 2 and calreticulin from human plasma [J]. *Thrombosis Research*, 1991, 63(5): 569 - 575.
- [7] Somogyi E, Petersson U, Hultenby K, *et al.* Calreticulin - an endoplasmic reticulum protein with calcium-binding activity is also found in the extracellular matrix [J]. *Matrix Biology*, 2003, 22(2): 179 - 191.
- [8] Kales S, Fujiki K, Dixon B. Molecular cloning and characterization of calreticulin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Immunogenetics*, 2004, 55(10): 717 - 723.
- [9] Luana W, Li F, Wang B, *et al.* Molecular characteristic and expression analysis of calreticulin in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2007, 147(3): 482 - 491.
- [10] Kawabe S, Yokoyama Y. Molecular cloning of

- calnexin and calreticulin in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and its expression in response to air exposure [J]. *Marine Genomics*, 2010, 3 (1): 19 – 27.
- [11] Fan W M, Hu Y L, Li C Z, *et al.* Cloning, characterization, and expression analysis of calreticulin from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. *Tsinghua Science and Technology*, 2008, 13 (4): 466 – 473.
- [12] Kenned T E, Kuhl D, Barzilai A, *et al.* Long-term sensitization training in *Aplysia* leads to an increase in calreticulin, a major presynaptic calcium-binding protein [J]. *Neuron*, 1992, 9 (6): 1013 – 1024.
- [13] Balakier H, Dziak E, Sojecki A, *et al.* Calcium-binding proteins and calcium-release channels in human maturing oocytes, pronuclear zygotes and early preimplantation embryos [J]. *Human Reproduction*, 2002, 17 (11): 2938 – 2947.
- [14] Zhang D X, Li X P, Sun S C, *et al.* Involvement of ER – Calreticulin – Ca^{2+} signaling in the regulation of porcine oocyte meiotic maturation and maternal gene expression [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2010, 77 (5): 462 – 471.
- [15] 袁一鸣, 李家乐, 汪桂玲, 等. 三角帆蚌 β -肌动蛋白基因的 cDNA 全长克隆及表达分析 [J]. *水产学报*, 2010, 34 (6): 691 – 700.
- [16] Lucu C. Calcium transport across isolated gill epithelium of *Carcinus* [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1994, 268 (5): 339 – 346.
- [17] Wilbur K M, Saleuddin A S M. Shell formation [M] // Wilbur K M, Saleuddin A S M, eds. *The Mollusca, Physiology*. New York: Academic Press, 1983.
- [18] Wang G L, Xu B, Bai Z Y, *et al.* Two chitin metabolic enzyme genes from *Hyriopsis cumingii*: Cloning, characterization, and potential functions [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2012, 11 (4): 4539 – 4551.
- [19] Kozlov G, Pocanschi C L, Rosenauer A, *et al.* Structural basis of carbohydrate recognition by calreticulin [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285 (49): 38612 – 38620.
- [20] Jaworski D C, Simmen F A, Lamoreaux W, *et al.* A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1995, 41 (4): 369 – 375.
- [21] Xu G, Fang Q Q, Keirans J E, *et al.* Cloning and sequencing of putative calreticulum complementary DNAs from four hard tick species [J]. *Parasitology*, 2004, 90 (1): 73 – 78.
- [22] Tsuji N, Morales T H, Ozols V V, *et al.* Molecular characterization of a calcium-binding protein from the filarial parasite *Dirofilaria immitis* [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1998, 97 (1 – 2): 69 – 79.
- [23] Beirao P S, Sorenson A L. Two types of action potentials in a secretory epithelium of a clam mantle [J]. *The Journal of Experiment Biology*, 1986, 121 (1): 179 – 195.
- [24] Beirao P S, Hamilton J, Nascimento M. Sodium-and calcium-sepdependent mechanisms in the action potential of the secretory-epithelium of a clam mantle [J]. *Journal Experiment Biology*, 1989, 145 (15): 395 – 402.
- [25] Simkiss K, Wilbur K M. *Biom mineralization: cell biology and mineral deposition* [M]. New York: Academic Press, 1989.
- [26] Pekkarinen M, Valovirta I. Histochemical and X-ray studies on tissue concretions and shell of *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus) [J]. *Journal of Shellfish Research*, 1997, 16 (1): 169 – 177.
- [27] Byrne M, Vesik P A. Microanalysis of elements in granules in *Hyridella aepressa* (Bivalvia): Multivariate analysis and biomonitoring potential [J]. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, 1996, 2 (2): 91 – 97.
- [28] 李文娟, 施志仪, 郝莹莹, 等. 应用激光共聚焦显微技术研究 Ca^{2+} 在三角帆蚌组织内的积累和分布 [J]. *水产学报*, 2011, 35 (2): 214 – 220.
- [29] Mount A S, Wheeler AP, Paradkar R E, *et al.* Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster [J]. *Science*, 2004, 304 (5668): 297 – 300.

Molecular characterization and expression analysis of calreticulin cDNA from *Hyriopsis cumingii*

XIA Xiulin¹, WANG Guiling^{1*}, BAI Zhiyi¹, LI Jiale^{1,2}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to study genes related to pearl formation in freshwater pearl mussel and their regulation mechanism, a 1 437 bp cDNA sequence of calreticulin gene from *Hyriopsis cumingii* (*HcCRT*) was obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE). It consisted of a 231 bp 5'-untranslation region (UTR), a 615 bp 3'UTR and a 591 bp open reading frame (ORF). The inferred amino acids sequence was composed of 196 amino acids, including a signal peptide of 21 amino acids and a mature peptide of 175 amino acids. The molecular weight of the peptide was predicted to be 22.4 ku, with a theoretical isoelectric point of 5.01. Amino acid sequence analysis showed that there was no obvious amino acid sequence of membrane domain. Results of the ProtScale online analysis showed that the protein was hydrophilic protein. Homology analysis indicated that *HcCRT* amino acid had a conservative sequence of calreticulin family and was highly conserved with *Danio rerio* (77%), *Crassostrea gigas* (70%), *Pinctada fucata* (70%). The sequence analysis showed that *HcCRT* shared two potential calreticulin family signature motifs with CRT from other species, KHEQNIDCGGGYLKVF and IMFGPDICG. The prediction results of *H. cumingii* *HcCRT* protein secondary structure and tertiary structure indicated that the protein contains the alpha helix and beta folding. Real-time quantitative PCR (RT-PCR) showed that *HcCRT* is expressed in a wide range of tissues including the mantle, blood, gill, foot, liver, kidney, intestine and muscle, with the highest level of transcripts in mantle, followed by blood, while there is rare expression in other tissues. These data suggested that *HcCRT* might be involved in pearl formation of *H. cumingii*. This study which was first time to obtain *HcCRT* gene from *H. cumingii* played an important role in exploring pearl formation of *H. cumingii*.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; calreticulin; molecular characterization; real-time quantitative PCR

Corresponding author: WANG Guiling. E-mail: glwang@shou.edu.cn