

栉孔扇贝几丁质酶基因的克隆及功能鉴定

王 俊, 高 静, 谢 军, 郑向南, 谢莉萍*, 张荣庆

(清华大学生命科学学院, 北京 100084)

摘要: 为研究栉孔扇贝壳形成机理, 首先应用质谱分析的方法, 研究了几丁质酶在栉孔扇贝壳的蛋白质组中所占的比例。进一步利用RACE技术克隆获得栉孔扇贝几丁质酶的cDNA, 全长共1587 bp, 可编码439个氨基酸残基。氨基酸序列的功能结构域分析表明, 该几丁质酶具有保守的几丁质酶特征结构域。组织表达分析表明, 栉孔扇贝几丁质酶在外套膜组织中表达量最高, 并且在外套膜边缘的表达量高于外套膜中心, 推测其参与了贝壳的形成。应用实时定量PCR方法, 检测贝壳损伤修复过程中基因表达水平, 结果显示, 几丁质酶基因表达水平呈现下调趋势, 暗示其作为负调控因子参与贝壳修复过程。利用RNAi技术降低外套膜组织中几丁质酶基因的表达水平, 同时应用扫描电子显微镜观察贝壳内表面的结构, 发现贝壳矿物晶体片层的轮廓呈现不规则沉积。综合以上实验结果, 推测几丁质酶通过水解几丁质来保证有机框架的有序性, 从而对贝壳形状和外观起到调控作用。研究几丁质酶的基因组织表达规律及其生物学功能, 将有助于揭示贝壳生物矿化的机制。

关键词: 栉孔扇贝; 几丁质酶; 生物矿化; 有机框架

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

几丁质(chitin)又被称为甲壳质、甲壳素, 存在于真菌的细胞壁、软体动物的贝壳以及节肢动物和甲壳类动物的外壳中^[1], 是一种在自然界广泛分布的含氮多糖类高分子^[2]。几丁质酶^[3](chitinase)作为参与几丁质代谢相关的酶之一, 最初在微生物中分离出来^[4], 随后在动植物以及病毒中均有发现^[5-8], 对其功能的研究和应用备受关注。

几丁质酶属于糖苷酶的一种, 根据糖苷酶的分类以及氨基酸的序列同源性, 几丁质酶可以分为糖基化水解酶18家族和19家族^[9-10], 其中18家族中的几丁质酶分布较为广泛, 在动植物以及微生物中都存在。已有研究表明, 几丁质酶在昆虫的生长蜕皮过程^[11]、植物的生长发育阶段^[12-14]和抵御病原真菌入侵方面都发挥了重要的作用^[15]。

在软体动物的贝壳中, 几丁质是贝壳有机物中含量较多的组分。对软体动物贝壳矿化的研究是生物矿化领域的一大分支, 贝壳形成的框架生长模型^[16]认为在矿物沉积之前, 由高度有序排列的几丁质组成不溶性的有机基质框架, 随后碳酸钙晶体以框架为基础进行成核生长和有序沉积。几丁质酶在几丁质的代谢过程中发挥重要的作用, 暗示其可能参与贝壳的矿化过程。栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是我国重要的经济贝类, 目前对其贝壳形成机理的研究相对较少。本研究工作中, 栉孔扇贝的几丁质酶基因cDNA得到克隆, 同时几丁质酶基因在栉孔扇贝中的组织分布以及在贝壳缺刻修复过程中的表达水平得到检测。此外, 初步研究了几丁质酶基因对贝壳表面矿物沉积的影响。通过以上实验, 期望能够对几丁质酶在矿化过程中的具体

收稿日期: 2016-04-22 修回日期: 2016-09-06

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA092204); 国家“九七三”重点基础研究发展计划(2010CB126405); 国家自然科学基金(J1310020)

通信作者: 谢莉萍, E-mail: lpxie@mail.tsinghua.edu.cn

功能进行一定的说明。研究的结果有助于揭示几丁质酶在栉孔扇贝壳矿化中的作用,为探究栉孔扇贝壳的形成机理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

栉孔扇贝购于青岛水产市场,在实验室内培养于人工配制的海水中,培养温度17~19 °C。

1.2 栉孔扇贝壳蛋白质组的质谱分析

将栉孔扇贝的贝壳用去离子水洗净,于5%氢氧化钠溶液中浸泡4~5 d,期间更换1次氢氧化钠溶液。浸泡过的贝壳取出后用去离子水清洗并晾干,使用研磨机打磨成粉末,依次使用0.45、0.25和0.15 mm孔径的筛子过筛后,收集备用。

将贝壳粉末溶解在0.8 mol/L的乙二胺四乙酸(EDTA)溶液中,置于4 °C的环境中搅拌溶解2 d后过滤,上清液为贝壳粉末溶解的饱和溶液;沉淀使用足量的EDTA溶液进行溶解至固体不再减少,离心后将余下的固体物收集至离心管中,加入3 mL 10 mmol/L DTT, 1% SDS的Tris-HCl溶液,混匀煮沸,即得到贝壳的EDTA不可溶组分。将贝壳粉末的饱和溶液装入MD44-3.5透析袋(宽度44 mm, MWCO: 3500)中至1/2体积处,置于去离子水中于4 °C的环境下透析72 h,每12 h更换1次去离子水。而后将透析袋中的液体进行超滤浓缩,即得到贝壳的EDTA可溶组分。将贝壳的EDTA可溶组分与不可溶组分进行SDS凝胶电泳,切胶后将样品送至清华大学生物医学测试中心蛋白化学平台进行质谱分析(MALDI-TOF/TOF质谱仪)。

1.3 栉孔扇贝组织总RNA的提取

利用TRIzol法(Invitrogen)提取栉孔扇贝组织的总RNA,使用1%的琼脂糖TBE凝胶电泳和Nanodrop分光光度计(Thermo Scientific)检测总RNA的质量。

1.4 几丁质酶的cDNA全长获取及序列分析

利用快速扩增cDNA末端(rapid amplification of cDNA ends, RACE)的方法使用SMARTer™ RACE cDNA Amplification试剂盒(Clontech)克隆得到栉孔扇贝外套膜组织中几丁质酶的cDNA全长,具体步骤按照说明书严格操作。其中,5'RACE和3'RACE的引物是根据栉孔扇贝外套膜组织转

录组数据库^[17]中的几丁质酶unigene序列进行设计,具体的序列见表1。最后,栉孔扇贝几丁质酶的高保真cDNA全长序列的验证使用引物F和引物R(表1)进行扩增(KOD-Plus-, TOYOBO)。

使用在线软件对栉孔扇贝几丁质酶进行序列分析,包括开放阅读框的预测(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>)、蛋白的信号肽预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、蛋白的理论相对分子质量以及理论等电点的预测(http://web.expasy.org/compute_pi/)、蛋白的功能结构域预测(<http://smart.embl-heidelberg.de/index2.cgi>)等。

1.5 几丁质酶基因的组织分布检测

收集栉孔扇贝外套膜边缘、外套膜中心、鳃、足、闭壳肌、内脏团和生殖腺7个组织的样品并进行RNA的提取。使用Realtime PCR的方法检测7个组织中几丁质酶基因的相对表达量。具体为使用PrimeScript® RT Master Mix Perfect Real Time (TaKaRa)试剂盒对组织的总RNA进行反转,并使用SYBRH Premix Ex Taq™ II Kit (TaKaRa)试剂,用罗氏实时荧光定量PCR仪(LightCycler480, Roche)进行检测。本研究的实验中选择β-actin作为内参基因^[18],基因相对表达水平的计算采用2^{-ΔΔCt}方法^[19]。Realtime PCR中使用的引物见表1。

1.6 栉孔扇贝壳的损伤修复实验

缺刻实验是用来检测贝壳损伤修复过程中

表1 PCR引物序列

Tab. 1 Primer sequences used in PCR	
引物名称 primer	引物序列 sequence
5'RACE-1	AGCCTCCAAGTGACAACATCATTACAAG
5'RACE-2	CAAGGGTAGCATAGGCGTAGACAATA
3'RACE-1	GGAGGAGCCTGACGACAAGAGT
3'RACE-2	ATCCAAGAATGTGAACAACCTAAGTC
confirm-F	CGCTCGTGTTCGGATGCTGATAAG
confirm-R	TTCATTTTATTATTGTGGAAACTGT
RNAi-F	TAATACGACTACTATAGGGACACGAGGAGGAGC CTGACG
RNAi-R	TAATACGACTACTATAGGGATCGTAGCCGACCC ACTCATC
Realtime-F	CGATGAGTGGGTCGGCTACG
Realtime-R	TGGTCTGCCTGGCGTTAGT
β-actin-F	TTCTTGGGAATGGAATCTGC
β-actin-R	ATTGTGCTACCACCGAAAG

基因的表达水平变化的一种实验方法^[20]。将一批大小相近, 生长情况相同的栉孔扇贝壳边缘处切去约5 mm, 在海水中培养。分别收集0 h, 缺刻后6、12、24、48、72、96和144 h的栉孔扇贝壳外套膜组织的样品, 每个时间点收集5只扇贝。对贝壳缺刻样品的RNA提取以及几丁质酶基因的表达水平检测同“实验材料”与“几丁质酶基因的组织分布检测”中步骤。

1.7 RNA干扰实验

栉孔扇贝几丁质酶基因的活体RNA干扰实验可以通过单一对几丁质酶基因的表达水平进行抑制, 从而对该基因的功能进行分析^[21]。双链RNA (dsRNA)的合成使用T7 RiboMAX™ Express RNAi System (Promega)试剂盒, 使用的引物序列见表1。取健康的栉孔扇贝24只, 其中实验组分别注射40和80 µg cht-dsRNA/200 µL无酶水, 阴性对照组注射40 µg GFP-dsRNA/200 µL无酶水, 空白对照注射200 µL无酶水, 每组6只扇贝。6 d后收集栉孔扇贝壳外套膜组织的样品, 进行总RNA的提取和基因表达水平的检测, 具体操作参照“栉孔扇贝组织总RNA的提取”和“几丁质酶基因的组织分布检测”实验步骤进行。同时收集各组的栉孔扇贝壳, 去离子水洗净后晾干, 利用扫描电子显微镜(SEM, FEI Quanta 200)进行贝壳内表面结构的观测。

2 结果

2.1 几丁质酶在栉孔扇贝壳中含量

对栉孔扇贝壳蛋白质组的质谱分析结果显示, 已见报道的基质蛋白shematin等被检测存在于EDTA可溶性组分中, 而几丁质酶存在于栉孔扇贝壳的EDTA可溶性组分与不可溶性组分中, 并且含量最高^[22]。几丁质酶在栉孔扇贝壳中的高丰度预示着它可能在栉孔扇贝壳形成中发挥重要的功能。

2.2 栉孔扇贝几丁质酶基因cDNA全长的获取及序列分析

根据栉孔扇贝壳外套膜组织转录组数据库^[17]中的几丁质酶unigene序列, 结合质谱分析得到的几丁质酶部分氨基酸肽段, 通过RACE的实验手段克隆得到栉孔扇贝几丁质酶的cDNA全长。栉孔扇贝的几丁质酶基因cDNA全长共1587 bp, 其中5'非编码区92 bp, 3'非编码区175 bp, 开放

阅读框1320 bp, 编码439个氨基酸残基(图1-a)。在线预测的结果显示栉孔扇贝几丁质酶相对分子质量约为50.56 ku, 理论等电点为6.22, 有一个长度为22个氨基酸的信号肽, 是一种分泌蛋白。栉孔扇贝几丁质酶的cDNA序列已经上传至GenBank数据库, 登录号为KU882680。

栉孔扇贝几丁质酶氨基酸序列的功能结构域分析表明, 其具有1个与几丁质的分解功能密切相关的糖苷水解酶18催化结构域(Glyco_18 domain)以及2个与几丁质和几丁质酶相互作用相关的低复杂度区域(low complexity region, LCR)(图1-b)^[23]。栉孔扇贝几丁质酶氨基酸序列具有几丁质酶保守的功能结构域, 预示着其功能的保守性。此外, 将栉孔扇贝几丁质酶的氨基酸序列与其他软体动物已经报道的几丁质酶以及几丁质酶类似蛋白的序列进行比对发现, 栉孔扇贝与虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)的几丁质酶序列具有高达92%的相似性, 该结果与这两个物种在进化角度上极相近的亲缘关系相符。

2.3 几丁质酶基因的组织分布

通过Realtime PCR的实验方法检测了栉孔扇贝7个组织中几丁质酶的表达情况, 结果显示, 相比于其他组织, 几丁质酶基因在外套膜中的表达量明显高于其他组织, 且在外套膜边缘的表达量约为外套膜中心的5倍(图2-a)。外套膜组织是参与贝类生物矿化的重要部位, 其中参与矿化相关蛋白的表达量远超过其他组织。在本研究中, 几丁质酶基因在栉孔扇贝壳外套膜组织中的高表达, 也暗示了它是参与栉孔扇贝壳矿化过程的重要蛋白。

2.4 贝壳损伤修复过程中几丁质酶基因的表达分析

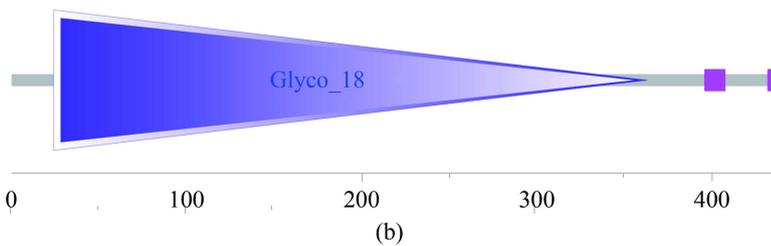
在对贝壳进行缺刻之后, 栉孔扇贝会立刻启动修复程序, 再生损伤部位的贝壳, 在此过程中参与贝壳矿化的蛋白表达量会产生明显的变化。本研究中在缺刻后的不同时间点分别采集5只栉孔扇贝的外套膜进行总RNA的提取, 反转后通过Realtime PCR对几丁质酶基因的表达水平进行检测。相比于对照组(缺刻0 h), 几丁质酶基因在6 h时的表达水平下降至正常水平的50%左右, 并且随着时间的延长, 几丁质酶基因的表达水平持续下降, 缺刻后144 h其表达量下降至

```

ga 2
gtgtcgggtgaggtggcgcctgtgttcggatgtctgataagcctgttagcgatatacaaaaaggattttctggataaatcatatcatcaag 92
atggacgcgaaagccgttctcaagggtgtgtgtctcctctgttacacattatcttaacagcagccgagttacaacgggtgtgttac 182
M D A K A V L Q G V L V L L L H I I L T A A E Y K R V C Y Y 30
agcggctggctctatacctgacaaggagagggcctggctcccaggacatcgaccatattctgtacacatattgtctacgctat 272
S G W S L Y R D K E R G L A P E D I D P Y L C T H I V Y A Y 60
gttacccctgatgatacgggaactaggatcattgttccgaacgataatcagaagaactcaactgttccggagggttccatagcatg 362
A T L D D T G T R I I V P N G Y E S E E L N L F R R F H S M 90
cgtgccaaaaaacgaagatctgtaatgatgtgtcacttggagcctggcctactgacagtaagctctttctaaagcgggttctctt 452
R A K N E D L V M M L S L G G W A T D S K L F S K T V S S L 120
gagaacatgcagcgttccggaggaagccatttaactatctgcgcaaacacgacttcgacggactggatattgactggcagttcccgcc 542
E N M Q R F A E E A I N Y L R K H D F D G L D I D W Q F P A 150
acgagaggcagctcccgacagagatgtagaaaactactacagattttaaggctgctccagtggaatttgaacacgaggaggagcctgac 632
T R G S P P E D V E N Y R F L R L L Q W E F E H E E E P D 180
gacaagagtaccctgatcctaactatctgttagatccgacagtggaaggcctccatttcttacgacctcctagatagcaagatgg 722
D K S T L I L T I C V D P T V E R A S I S Y D L P R Y A R W 210
gtgaattggataaacatgaagatgttgaacttctccggccactggaacgatccgattattgctaatcaccacagccccgtacagtgct 812
V N W I N M K M F D F S G H W N D P I I A N H H S P L Y S A 240
cagcaccacaagaatgtgaacaactaagtcgatattgggtaacaaggcgtgccagtcataagatcgtgatcggactgcctatgtac 902
H D P K N V N N L S R Y W V N K G V P R H K I V I G L P M Y 270
ggctgctcatttctctggccaacaccaactacacacagcctggagctcccgccatcggaccgggatctgatgatggagcagcctacccc 992
G R S F S L A N T N Y T Q P G A P A I G P G S D D G D G Y P 300
atatcacagcttggatctgatataaaatgggtgccaggagatgatgatcgcagacaacagagtgcccttacgtgtaattggcagatgag 1082
I S Q L C H L I K N G A R E M M I A D K R V P Y V V I G D E 330
tgggtcggctacgataccccgagagatcaaaacaaaaggcctgtatcgcattcaacaacttctcgggtggcgtcatgattggacattg 1172
W V G Y D N P E S I K Q K A R I A F N N F L G G V M I W T L 360
gacatggaatgaccaccgtggctcctgtggcctgaccgttgataaacgcagcgtggacgggtctcaacgccgccaggggtataat 1262
D M D D H R G A C G R P Y P L I N A A L D G L N A R H G Y N 390
gagctcattactaacccaggcaggaccagcccaacagccgcccaaaaaggagatttatcgacagagagcaactgggaggggaaatg 1352
E L I T N A R Q D Q A Q Q A A A K K E I Y R Q R A L G W E M 420
caggacaacaagaactatacatcaccaacaagaggaggtctgtaggcgagcgtgtagctgtaactcaagggttacgactacgggtc 1442
Q D K Q E R I H H Q Q R G G R R R G W * 439
ggccaataaatgggtgtatgggtgtaatttaataaatgcattaactcaaaagataccgctacttccgggtgtagatactacagtttccca 1532
caataataaatgaaatatttagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1577

```

(a)



(b)

图 1 栉孔扇贝几丁质酶基因的cDNA序列分析

(a)栉孔扇贝几丁质酶基因cDNA序列及氨基酸序列；阴影部分为预测功能域；*代表终止密码子；(b)几丁质酶蛋白结构域预测

Fig. 1 Bioinformatic analysis of the chitinase gene in *C. farreri*

(a) full-length sequence and amino acid sequence of the chitinase cDNA; the shaded parts are predicted function domains and * is the stop codon; (b) the predicted structure domain of the chitinase protein

正常水平的20%(图2-b)。表明了栉孔扇贝壳损伤修复的过程中，几丁质酶基因表达水平呈现下调趋势，暗示其作为负调控因子参与贝壳修复过程。

2.5 干扰栉孔扇贝几丁质酶基因的表达会影响贝壳的形状和外观

为了进一步研究栉孔扇贝几丁质酶在贝壳矿化中的作用，本团队进行了RNAi实验，通过向栉孔扇贝闭壳肌中注射几丁质酶双链RNA来

单一地抑制几丁质酶基因的表达。提取注射6 d后的栉孔扇贝的外套膜组织，对几丁质酶基因的表达水平进行检测。结果显示，相比于空白组(注射了200 μL无酶水)和阴性对照组(注射了40 μg GFP-dsRNA/200 μL无酶水)而言，注射40 μg cht-dsRNA/200 μL无酶水实验组的几丁质酶基因表达水平被抑制到正常水平的75%左右，注射80 μg cht-dsRNA/200 μL无酶水的实验组中，几丁质酶的表达水平被进一步抑制到60%以下(图3)。这

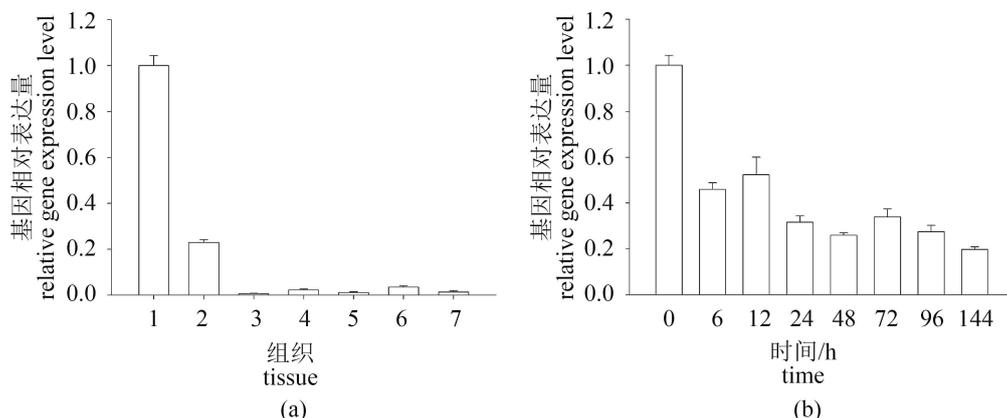


图2 栉孔扇贝几丁质酶基因组织分布与缺刻实验实时定量PCR结果

(a)栉孔扇贝不同组织中几丁质酶基因表达情况: 1. 外套膜边缘; 2. 外套膜中心; 3. 鳃; 4. 足; 5. 生殖腺; 6. 内脏团; 7. 闭壳肌; (b)缺刻处理后几丁质酶基因的表达情况

Fig. 2 Real-time quantitative PCR results of the chitinase tissue expression level and shell notching

(a) relative gene expression levels of chitinase in different tissues of *C. farreri*; 1. mantle edge; 2. mantle pallial; 3. gill; 4. foot; 5. gonad; 6. visceral mass; 7. adductor muscle; (b) response of the chitinase gene during shell regeneration after shell notching

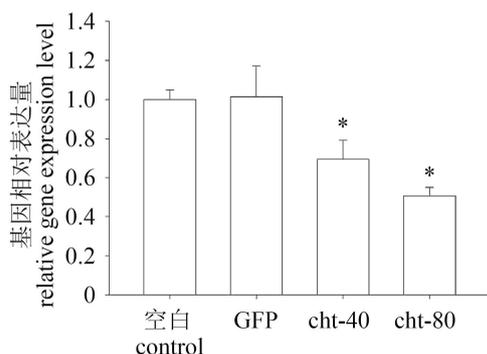


图3 RNA干扰实验

*.与对照组差异极显著, $P < 0.01$

Fig. 3 RNAi assay

*. significant difference with control group, $P < 0.01$

说明实验成功地对栉孔扇贝几丁质酶基因的表达水平进行了抑制, 而且其抑制程度与注射的dsRNA量呈现浓度相关的效应。

同时对注射6 d后的栉孔扇贝的贝壳表面结构进行扫描电镜观察。注射无酶水的空白组和注射了40 μg GFP双链RNA的阴性对照组的栉孔扇贝的贝壳内表面边界明确, 上端形成尖峰, 矿化物片层堆叠(图4-a, 4-b)。注射40 μg 几丁质酶双链RNA的实验组中, 贝壳表面大致能够看出矿化物片层的轮廓, 但边界已经不规则, 尤其是尖端的形状呈现出融合的状态(图4-c); 当注射几丁质酶双链RNA的量提升至80 μg 时, 矿化物片层已经大幅度粘连成片, 之间的缝隙分界

不明显, 虽然能够模糊看出片层结构, 但每个矿化物片层的形状更加不规则, 其轮廓趋于消失(图4-d)。这些结果表明了敲低栉孔扇贝外套膜组织中几丁质酶基因的表达, 贝壳矿物晶体片层的形状轮廓将出现不规则沉积。

3 讨论

关于软体动物的贝壳形成机理, 目前被普遍接受的一种假设是框架式的生长模型。在这种模型中, 矿物沉积之前, 几丁质等各种有机基质组分会先行被分泌到间液中, 以两层几丁质作为贝壳形成的结构框架, 控制贝壳有序地形成并且决定碳酸钙晶体的生长方向。在这一矿化模型中, 几丁质框架的形成在早期就决定了贝壳晶体的结构。参与几丁质生理过程相关的所有酶类中, 几丁质合成酶(chitin synthetase, CS)^[24]与几丁质酶的作用最为突出。几丁质合成酶是一种膜结合的糖苷转化酶, 在其作用下可以将几丁质前体物合成几丁质, 促使几丁质分子的延长; 而几丁质酶则催化几丁质的水解过程。二者相反相成的作用在生物体内共同控制几丁质的合成与水解, 以保证生物体几丁质相关的生理过程有序进行。

几丁质合成酶是一种膜结合蛋白, 其氨基酸序列不存在信号肽, 属于非分泌蛋白; 而几丁质酶是一种分泌蛋白, 因此在本研究中的蛋

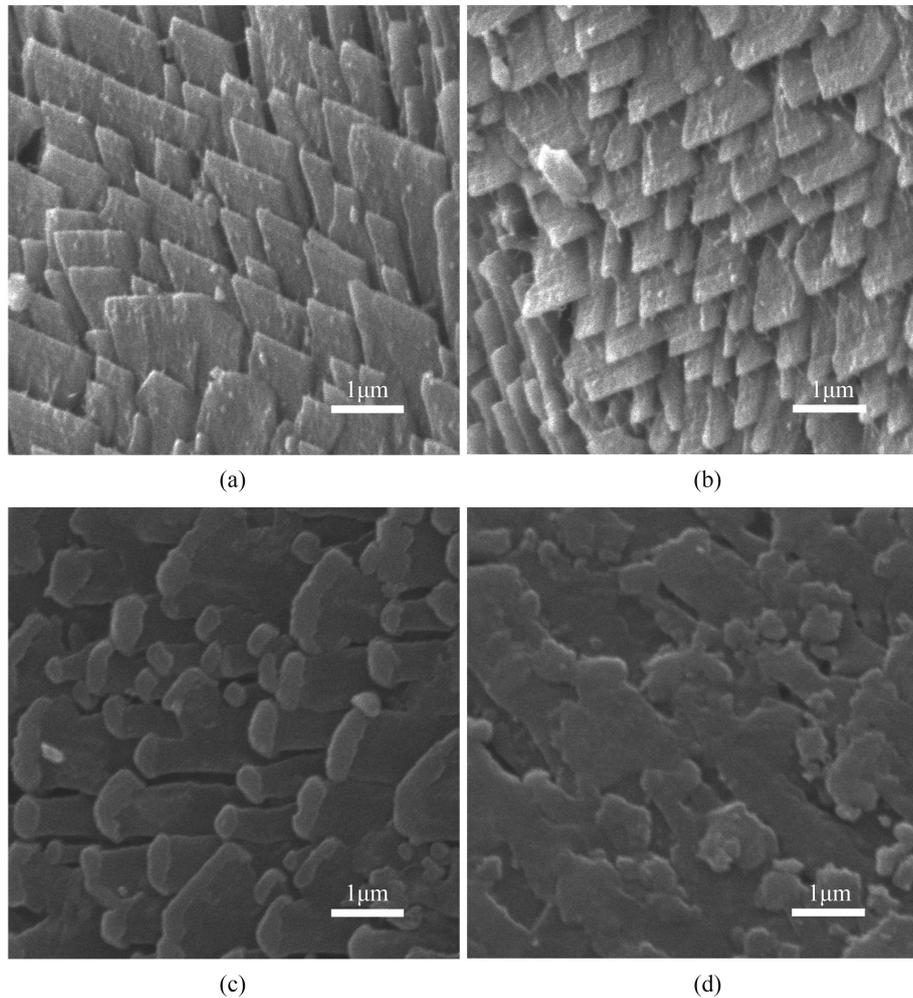


图4 扫描电子显微镜观察贝壳结构

(a)空白对照(注射200 μL 无酶水); (b)阴性对照(注射40 μg of GFP-dsRNA/200 μL 无酶水); (c)实验组(注射40 μg of cht-dsRNA/200 μL 无酶水); (d)实验组(注射80 μg of cht-dsRNA/200 μL 无酶水)

Fig. 4 The structural observation of the shell by SEM

(a) group injected with 200 μL of DNase/RNase-free water; (b) group injected with 40 μg of GFP-dsRNA diluted in 200 μL of water; (c) group injected with 40 μg of chitinase-dsRNA diluted in 200 μL of water; (d) group injected with 80 μg of chitinase-dsRNA diluted in 200 μL of water

白质的质谱分析中,于栉孔扇贝的贝壳蛋白质组中发现几丁质酶大量存在而没有检测到几丁质合成酶的存在。根据贝壳形成的框架理论,对前期几丁质框架的构建进行了如下猜想,在形成几丁质框架的前期,几丁质合成酶发挥主要作用,进行几丁质的合成,此时几丁质酶的表达被抑制,以保证几丁质的累积生成,新生成的几丁质被运输到生物体外进行贝壳框架的构建。由于几丁质合成酶是非分泌蛋白,不能被分泌到细胞外,因此必然有其他的分子对合成的几丁质进行调控,使其能够构建成有序的框架供后续矿化过程中晶体的生长。而且在形成框架之后多余的几丁质需要被降解,以避免

对正常的结构产生影响。因此推测,几丁质酶可能在这一过程中开始表达,被分泌到贝壳上并在框架的修饰过程以及分解多余几丁质的过程中发挥作用。而当贝壳的生长达到一定的成熟程度时,栉孔扇贝体内的几丁质合成酶和几丁质酶的表达就趋于平衡,以维持整个贝壳的正常形态和生长趋势。

在软体动物中,外套膜是生物矿化过程的重要部位,许多与矿化过程直接相关的分泌蛋白都在外套膜中大量表达并分泌到体外实行其矿化功能。本研究中几丁质酶的表达具有明显的组织特异性,在外套膜组织中的表达水平显著高于其他组织,也暗示了其在矿化过程中的

重要作用。进行几丁质酶组织分布的实验个体是大小与发育程度相近的成熟扇贝, 此时贝壳的发育已经成熟, 贝壳的生长进入平衡时期。贝类在生存的过程中, 在水流等因素的作用下贝壳的外侧势必会有磨损, 而为了维持贝壳的正常形态厚度, 其内部也在不断地生成新的贝壳矿物, 这两个过程在成熟个体中应该趋于平衡。因此在这种状态下, 几丁质酶会维持在一个正常的表达水平。

而在对贝壳进行缺刻处理之后, 贝壳的生长平衡状态被打破, 进入损伤修复过程的贝壳生长速率会明显提升, 在新生贝壳形成的过程中有机框架需要构建, 大量的几丁质需要累积, 所以具有几丁质水解作用的几丁质酶的表达会被抑制, 以保证有足够的几丁质合成用于有机框架的构建。在RNAi实验中, 对几丁质酶的表达进行抑制后, 也干扰了栉孔扇贝体内几丁质的代谢平衡, 几丁质的合成过程正常进行, 而堆积在贝壳表面多余的几丁质缺少几丁质酶的水解清理, 贝壳正常框架的形成受阻。对贝壳内表面的晶体结构观察发现, 在几丁质酶被抑制的情况下, 贝壳的晶体虽然能够分辨出片层结构, 但是其每个片层的轮廓已经呈现出不规则状态。在低浓度抑制的实验组中, 晶体片层的顶部不再呈现规则的棱角, 整体初步显示出融合的趋势; 而在高浓度抑制的实验组中, 每个晶体的轮廓只能依稀分辨出, 矿物片层的粘连程度更为严重。推测由于几丁质酶的表达被抑制, 几丁质累积后形成的框架不能得到充分的修饰, 多余的几丁质沉积使得其原本规则的形状空间被无序地占用填充, 对于后形成的矿物片层的形状也产生较为明显的影响。

综上所述, 本研究获得了栉孔扇贝几丁质酶基因的cDNA序列, 并对其在贝壳矿化过程中的功能进行了初步的探究, 为栉孔扇贝贝壳的形成机理提供理论基础。然而, 在贝壳有机框架的形成中, 几丁质酶的具体功能是单纯负责清除多余的几丁质, 或是具有其他的调控修饰功能以保证正常框架的形成, 还需要深入研究。

参考文献:

- [1] 王治伟, 刘志敏. 微生物几丁质酶研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(3): 439-442.
Wang Z W, Liu Z M. Advance in study and application on chitinase produced by microbes[J]. Letters in Biotechnology, 2006, 17(3): 439-442 (in Chinese).
- [2] Boller T, Gehri A, Mauch F, *et al.* Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function[J]. *Planta*, 1983, 157(1): 22-31.
- [3] Cornelius C, Dandrifosse G. Substrate specificity of the β -1, 4-N-acetylglucosaminidases of vertebrates[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1977, 5(1): 53-56.
- [4] Campbell L L, Williams O B. A study of chitin-decomposing micro-organisms of marine origin[J]. *Journal of General Microbiology*, 1951, 5(5 Suppl.): 894-905.
- [5] Vierheilig H, Alt M, Neuhaus J M, *et al.* Colonization of transgenic *Nicotiana sylvestris* plants, expressing different forms of *Nicotiana tabacum* chitinase, by the root pathogen *Rhizoctonia solani* and by the mycorrhizal symbiont *Glomus mosseae*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1993, 6(2): 261-264.
- [6] Benhamou N, Broglie K, Chet I, *et al.* Cytology of infection of 35S-bean chitinase transgenic canola plants by *Rhizoctonia solani*: cytochemical aspects of chitin breakdown *in vivo*[J]. *Plant Journal*, 2002, 4(2): 295-305.
- [7] Zhu Q, Maher E A, Masoud S, *et al.* Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco[J]. *Nature Biotechnology*, 1994, 12(8): 807-812.
- [8] Hiramatsu S, Fujie M, Usami S, *et al.* Two catalytic domains of *Chlorella* virus CVK2 chitinase[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 89(3): 252-257.
- [9] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities[J]. *Biochemical Journal*, 1991, 280(2): 309-316.
- [10] Henrissat B, Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases[J]. *Biochemical Journal*, 1996, 316(Pt 2): 695-696.
- [11] Bade M L. Metabolic conversions during pupation of the cecropia silkworm. 2. Tests for the operation of the glyoxylate cycle[J]. *Biochemical Journal*, 1962, 83: 478-482.
- [12] Fraser R S S. Evidence for the occurrence of the "pathogenesis-related" proteins in leaves of healthy tobacco plants during flowering[J]. *Physiological Plant Pathology*, 1981, 19(1): 69-76.

- [13] Dassi B, Dumas-Gaudot E, Asselin A, *et al.* Chitinase and β -1, 3-glucanase isoforms expressed in pea roots inoculated with arbuscular mycorrhizal or pathogenic fungi[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 1996, 102(1): 105-108.
- [14] Hanfrey C, Fife M, Buchanan-Wollaston V. Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related proteins[J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 30(3): 597-609.
- [15] Sela-Buurlage M B, Ponstein A S, Bres-Vloemans S A, *et al.* Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and [beta]-1, 3-glucanases exhibit antifungal activity[J]. *Plant Physiology*, 1993, 101(3): 857-863.
- [16] Addadi L, Joester D, Nudelman F, *et al.* Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes[J]. *Chemistry*, 2006, 12(4): 980-987.
- [17] Shi M J, Lin Y, Xu G R, *et al.* Characterization of the Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) mantle transcriptome and identification of biomineralization-related genes[J]. *Marine Biotechnology*, 2013, 15(6): 706-715.
- [18] Jia G C, Liang J, Xie J, *et al.* cfMSP-1, an extremely acidic matrix protein involved in shell formation of the scallop *Chlamys farreri*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 185: 34-41.
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] Mount A S, Wheeler A P, Paradkar R P, *et al.* Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster[J]. *Science*, 2004, 304(5668): 297-300.
- [21] Suzuki M, Saruwatari K, Kogure T, *et al.* An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation[J]. *Science*, 2009, 325(5946): 1388-1390.
- [22] Yano M, Nagai K, Morimoto K, *et al.* Shematin: a family of glycine-rich structural proteins in the shell of the pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 144(2): 254-262.
- [23] Coletta A, Pinney J W, Solís D Y W, *et al.* Low-complexity regions within protein sequences have position-dependent roles[J]. *BMC Systems Biology*, 2010, 4(1): 43.
- [24] Behr J B, Gautier-Lefebvre I, Mvondo-Evina C, *et al.* Inhibition of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae* by a new UDP-GlcNAc analogue[J]. *Journal of Enzyme Inhibition*, 2001, 16(2): 107-112.

Cloning and mineralization-related functions of the chitinase gene in *Chlamys farreri*

WANG Jun, GAO Jing, XIE Jun, ZHENG Xiangnan, XIE Liping*, ZHANG Rongqing
(School of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Chitin is the main component of mollusk shell organic scaffold and its metabolism is important for shell mineralization. Chitinase with the function of chitin hydrolysis plays a key role during chitin metabolism process and is related to the formation process of shell organic scaffold. In this study, by the mass spectrum analysis of shell protein, it was proved that chitinase had an abundant amount in the shell of *Chlamys farreri*. The cDNA sequence of gene chitinase was obtained by RACE and its full length is 1587 bp, coding 439 amino acid residues. Analysis of chitinase protein sequence with bioinformatics software shows that it has a conservative function domain existing in chitinase protein family with the function of chitin hydrolysis. Chitinase in *C. farreri* had a much higher expression level in the mantle tissue than in other tissues, especially the area of mantle edge. In the process of shell regeneration after shell notching, the expression level of chitinase showed a decreasing tendency indicating that chitinase responded as a negative regulatory factor during shell regeneration. After knocking down the expression of chitinase, the structure of the mineral slices was irregular and fused with a fuzzy shape and unclear boundary. In conclusion, it is suggested that chitinase in *C. farreri* might be related to the formation of shell organic scaffold with its function of chitin hydrolysis, which is also important during the process of shell biomineralization.

Key words: *Chlamys farreri*; chitinase; biomineralization; organic scaffold

Corresponding author: XIE Liping. E-mail: lpxie@mail.tsinghua.edu.cn

Funding projects: National High Technology Research and Development Program of China (2012AA092204); National Basic Research Program of China (2010CB126405); National Fund for Fostering Talents of Basic Science (J1310020)