

三角帆蚌 *EFCB1* 基因 cDNA 序列克隆及表达研究

祁晓翔¹, 李文娟¹, 尚朝¹, 周子睿¹, 尚攀¹, 施志仪^{1,2*}

(1. 上海海洋大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 201306;

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

摘要: 为了发掘更多三角帆蚌具有 EF-hand 结构域的功能基因及其蛋白质, 本研究运用 RACE-PCR 技术, 克隆得到了三角帆蚌包含 EF-hand 结构域钙结合蛋白 1 基因 (EF-hand calcium-binding domain-containing protein 1, *EFCB1*) 的 cDNA 全长并进行了生物信息学分析; 通过 real-time Q-PCR 技术, 分析了 *EFCB1* 基因在三角帆蚌 10 个组织, 以及内脏团、外套膜插核后不同时间点的时空表达特点。结果表明三角帆蚌 *EFCB1* 基因 cDNA 序列全长 981 bp, ORF 为 531 bp, 编码 176 个氨基酸残基, 5'-UTR 239 bp 和 3'-UTR 211 bp。EFCB1 分子式为 C₈₇₇H₁₃₄₈N₂₃₈O₂₇₀S₁₀, 分子量约 19.9 ku, 等电点为 4.70, 不稳定系数为 62.65, 属亲水蛋白。其序列无信号肽序列, 存在 1 个跨膜区域和 2 个 EF-hand 结构域, EF-hand 模块分别为 DLNDDKLISPEE (98-109) 和 DTNGDDKLDGEE (129-140)。荧光定量结果显示三角帆蚌 *EFCB1* 基因在各组织中均有表达, 其中在肠和鳃中表达量最高 ($P < 0.05$), 外套膜中表达量显著高于内脏团 ($P < 0.05$)。EFCB1 基因在插核后不同时期的外套膜和内脏团育珠部位组织中表达具有显著差异 ($P < 0.05$), 在外套膜中的表达量均显著高于内脏团 ($P < 0.05$), 在插核后第 20 天时表达量显著高于各时期 ($P < 0.05$)。研究表明, EFCB1 在三角帆蚌 Ca²⁺ 的吸收过程中发挥调节作用, 在珍珠囊形成过程中以及珍珠形成初期具有重要功能。

关键词: 三角帆蚌; *EFCB1*; EF-hand 结构域; 有核珍珠; 基因表达

中图分类号: Q 753; S 914

文献标志码: A

珍珠主要由碳酸钙和有机质组成, 其中碳酸钙钙约占了 95% 以上, 可见 Ca²⁺ 是珍珠形成过程中的重要因子。贝类钙代谢通过调控钙的吸收、转运、贮藏及沉积从而参与和调控贝壳和珍珠的形成^[1]。EF-hand 蛋白在脊椎动物钙代谢中发挥重要作用。研究发现, 在脊椎动物骨形成过程中, EF-hand 蛋白在成骨细胞和破骨细胞生理活动过程中发挥调节作用, 如骨粘连蛋白 (osteonectin)^[2-3]、钙周期蛋白 (calyculin)^[4]、S100A4^[5] 及钙结合蛋白 (calbindin, Calb)^[6] 等。贝类的 EF-hand 蛋白也具有调控钙代谢的功能^[7-8], 进而参与调节贝壳和珍珠质的形成, 是影响珍珠质 CaCO₃ 晶体形成的有机成分之一。目前, 在贝类中已发现的钙调蛋白 (calmodulin,

CaM)^[9-11]、钙调素类似蛋白 (calmodulin-like, CaLP)^[12]、钙调磷酸酶 (calcineurin, Cn)^[13]、肌质钙结合蛋白 (sarcoplasmic calcium-binding protein, SCP)、肌钙蛋白 C (troponin C, TnC) 都具有 EF-hand 结构域, 并对珍珠形成过程中 Ca²⁺ 的吸收和运输起着重要作用。

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 是我国特有的淡水珍珠蚌种, 所产珍珠占世界总淡水珍珠 98% 以上的份额^[14], 故占据重要的经济地位。随着现代生物技术的发展, 关于外套膜、内脏团有核珍珠的培育研究及其相应的生物矿化分子机制被相继报道^[15-16]。然而在淡水贝类育珠过程中, 钙代谢相关基因的功能研究相对较少, 尤其在外套膜和内脏团 2 个育珠组织中培育有核珍珠过程中钙代

收稿日期: 2014-11-27 修回日期: 2015-05-08

资助项目: 国家自然科学基金 (31201991); 教育部博士点基金 (20123104120003); 上海市优青项目 (ssc11004)

通信作者: 施志仪, E-mail: zyshi@shou.edu.cn

谢相关基因的表达差异研究还未见报道。因此,发掘更多三角帆蚌育珠组织中具有 EF-hand 结构域的功能基因及其蛋白,对探索珍珠生长机制及培育优质珍珠具有十分重要的意义。

本研究根据已报道的 *CaM*、*CaLP*、*Calb* 等包含 EF-hand 结构域蛋白的保守区域设计引物,运用 RACE-PCR 技术获得了三角帆蚌 *EFCB1* 基因的 cDNA 序列,并对基因的结构和相应的氨基酸序列进行了生物信息学分析。利用 real-time Q-PCR 技术对 *EFCB1* 基因在三角帆蚌各组织和插核后不同时期外套膜和内脏团育珠部位组织表达情况进行了检测分析,初步研究 *EFCB1* 蛋白在珍珠形成中的作用,为后续研究三角帆蚌珍珠形成过程中钙代谢调控机理奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

三角帆蚌采购于浙江省金华市威望养殖新技术有限公司生产基地,选取体质量均一,长、宽和高差异较小的 200 只 2 龄三角帆蚌,随机选取其中 20 只为对照组(不进行插核),180 只为实验组,在上海海洋大学自然水体的河道内进行吊养。

在 2013 年 5 月(水温 15 ~ 19 °C),采用珠核加小片法插核,分别在实验组每只三角帆蚌的外套膜后部和内脏团同时各插一个直径 3 mm 经高压灭菌干燥后的珠核,将 2 mm × 2 mm 的外套膜外膜小片贴到珠核上。将插核手术处理后的育珠蚌在实验室水缸中暂养 2 d 后垂直吊养于育珠水域,吊养位置为水面下 20 cm 处,所有实验用蚌均在同一条件下进行常规育珠养殖。

取未插核 2 龄三角帆蚌 3 只,断其闭壳肌,立即取其外套膜、内脏团、鳃、闭壳肌、斧足、肝脏、肠、肾脏、性腺组织和血淋巴置于液氮中,用于组织表达分析。随机抽取对照组和实验组插核后第 5、20、50、90 天珠核珍珠质沉积较好的三角帆蚌各 3 只,分别采集内脏团和外套膜育珠部位组织用于育珠时间表达检测。

1.2 实验方法

总 RNA 提取和检测 按照 Trizol (Invitrogen, 美国)试剂说明书进行三角帆蚌各时期和各组织样品总 RNA 的提取,分别用 Nanodrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, 美国)分光光度计和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其纯度和完整性。反转录过程按照 *M-MLV* Reverse

Transcriptase (Promega, 北京)的操作步骤进行。

基因 cDNA 序列的扩增与克隆 参照 GenBank 中 *CaM*、*CaLP*、*Calb* 等含有 EF-hand 结构域基因的 cDNA 序列,在 同源保守区内设计引物 *EFCB1*-F (TACATCGCATCAACCAACTC)、*EFCB1*-R (CCGTCACCATCTAAACATAAT)。以各组织混合 cDNA 为模板,利用 *EFCB1*-F 和 *EFCB1*-R 引物进行 PCR 扩增。PCR 采用 2 × TransStart FastPfu PCR SuperMix (Transgen, 北京)反应体系进行。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶回收纯化与 PMD19-T 载体 (TaKaRa, 日本)连接转化入感受态大肠杆菌 DH5 α (实验室保存)中,经菌落 PCR 验证后送阳性克隆于上海生工生物公司测序。

根据所得基因片段设计 RACE 引物:5'-outer (CCAGTGCCCGTATGTCAAGAG)、5'-inner (GTGCTGTAGCCTGGCGGTTTCG)、3'-outer (GCTGCCAACTCAGGGATACTTCT)、3'-inner (AATTCTTCTCCATCCAGCTTGTC),按照 5'-and 3'-Full RACE Kit (TaKaRa, 日本)使用说明进行操作,分别进行 5' RACE 和 3' RACE 扩增。RACE PCR 产物经回收、连接、转化、克隆并测序后,得到 *EFCB1* 基因的 cDNA 的 5'端和 3'端序列。

生物信息学分析 应用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>)对 cDNA 进行其开放阅读框 (ORF)分析,并进行比对、分析其氨基酸序列。应用 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>)对其编码蛋白质的分子量、等电点等基本性质进行理论预测;应用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对其进行信号肽预测;应用 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对蛋白质的跨膜区进行预测;应用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)对其疏水/亲水性进行分析;应用 PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>)对其结构域进行分析;应用 ClustalX 软件对其同源蛋白质进行比对分析;应用 MEGA 5.1 软件,分别采用邻接法 (neighbour-joining) 及最大简约法 (maximum parsimony)对同源蛋白质进行系统进化树构建,利用自展法 (bootstrap)进行 1 000 次重复,对系统树进行可信度评估,其余参数为默认。

***EFCB1* 基因的表达研究** 根据 *EFCB1* 基因保守区域设计特异的定量引物:*EFCB1*-Q-F (ATTATGACCTGAACGACGACAAAC)、*EFCB1*-

Q-R (AGCCGAACTAATTCTTCTCCATC), 内参基因为三角帆蚌 β -actin (HM 045420), 引物分别为: β -actin-Q-F (TGTGCTATGTAGCCCTCG)、 β -actin-Q-R (GCAGATTCCATTCCCAAG)。利用 CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, 美国) 平台进行实验。先制备目的基因和内参基因 (β -actin) 的标准曲线, 然后进行目的基因的定量实验。20 μ L 的反应体系包括 1 μ L cDNA、上下游引物各 0.2 μ L、10 μ L 的 2 \times iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 美国) 和 8.6 μ L dH₂O。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s 和 60 $^{\circ}$ C 15 s, 采集荧光 40 次, 然后进行熔解曲线的扩增。标准曲线结果显示目的基因和内参基因的 R 值均大于 0.9, 相应的扩增效率 (E) 均介于 95% ~ 100%。每个基因设置 3 个生物学重复, 3 次技术重复。

EFCB1 基因相对表达量数据运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算, 其数值用平均值 \pm 标准偏差 (mean \pm SD) 表示, $n=3$ 。*EFCB1* 基因相对表达量以内脏团插核后 50 d 的表达量为对照, 在各组织中的相对表达量以肾脏中表达量为对照, 然后数据采用 SPSS 19.0 软件中的 One-Way 方差分析 (ANOVA), 使用 Dunnett's T multiple comparisons 进行相对表达分析, $P < 0.05$ 表示存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 三角帆蚌 *EFCB1* 基因的克隆和序列分析

通过实验获得三角帆蚌 *EFCB1* 的 cDNA 长 981 bp (图 1), 其中开放阅读框为 531 bp, 编码 176 个氨基酸残基, 5'-UTR 239 bp 和 3'-UTR 211 bp。在其 3'-UTR 区域包含典型的多聚赖氨酸加尾信号序列 AATAAA 和 PolyA 尾巴。

```

1   GGAATTGGGAGGAAATAGATCATTTTACTACTTAATATAACAAGTGGTCAACTTCTATGT
61  GCACTCCTTATTCTATTTAAAAATGTCAAGTCAGCAATTGTAGTATTTTCTCCTTTTGGT
121 CAGTTTTTCTCCTACACGTTTAAATTCAGCCATCGTATATAAAGCTGCTGATTGCAAGTAG
181 TTGATGTATTCCACGACCGGTGATCATTACAAGTATACATCGCATCAACCACTCAAAT
240 ATGTATACTGGGCGTGTGTTGATCTCTTGGTTGTGACAGTAGTATTGCTAGATGGTGTCT
1   M Y T G A C L I L L V V T V V L L D G A
300 GTAGCCTGGCGGTTTTCGACTACCGCGGATTACATCCCAGTGCCCGTATGTCAAGAGGTC
20  V A W R F R L P R I H I P V P V C Q E V
360 TGCCACACGGAATGTCCCAACTTTGGCGATAATGCAGGGTGGCACCAGCCATCACGGCA
40  C H T E C P N F G D N A G W H P A I T A
420 CATTGTGTCAATTAGCATGCCGAAGGGTTTGAAGAGAAGTATCCCTGAGTTGGCAGCG
60  H L C H L A C R R V C K R S I P E L A A
480 GCTGATGAAGATTATCAAGTTGTACCCATGTCCCGAGACTTCCGTCATTATGACCTGAAC
80  A D E D Y Q V V P M S R D F R H Y D L N
540 GACGACAACTTATATCACCCGAAGAGTTTGCAAAATGCTCAGAAAGTTCCACTGGATGAA
100 D D K L I S P E E F A N A Q K V P L D E
600 GTTTATAATGTGTTTCAATTTGCTGATACAAATGGAGATGACAAGCTGGATGGAGAAGAA
120 V Y N V F Q F A D T N G D D K L D G E E
660 TTAGTTTCGGCTCCATTTATTTTGAAGTGAGAAAACATCAGGTGAAAATGGCTATATT
140 L V S A P F I F E S E K T S G E N G Y I
720 CAGGAGAAAGCGGATCGCATGTCTGAGACTGAAGAATCTTTACATCAATAATAAAGAAAT
160 Q E K A D R M S E T E E S L H Q *
780 TATACAACGCTATGAATCTTTAATTATGTTTAGATGGTGACGGTACACTTACATTTGAAA
840 AGGTCGTTTTATAATAAATGCAACATACTACTATTTAAAAATATTCATAACGTAGCAGA
900 CATACTGGTGTCTTAGCTGAACGGAATTTTAGAACCTTTTCTATGGTTCCACGAAAC
960 TTTAAGAAAAAATAAAAAA

```

图 1 三角帆蚌 *EFCB1* 基因的 cDNA 序列及预测的氨基酸序列

* 表示终止密码子; 灰色阴影部分表示 EF-hand 结构域; 黑色框内“ AATAAA ”为多聚腺苷酸加尾信号

Fig. 1 The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *EFCB1* in *H. cumingii*

* indicated stop codon; the two EF-hand calcium-binding motifs are shadowed; putative polyadenylation signals (AATAAA) are boxed

2.2 三角帆蚌 *EFCB1* 蛋白预测和结构分析

根据 ProtParam tool 对三角帆蚌 *EFCB1* 的氨基酸序列预测, 分子式为 C₈₇₇H₁₃₄₈N₂₃₈O₂₇₀S₁₀, 分子量约为 19.9 ku, 理论等电点为 4.70, 不稳定系数为 62.65, 表明此蛋白质的性质不稳定。利用 SignalP 4.1 Server 分析表明, 该序列无信号肽序列。TMHMM Server v. 2.0 分析表明, 该序列存

在一个跨膜区域, 第 1 ~ 4 个氨基酸在膜内, 第 5 ~ 23 个氨基酸在膜上, 第 24 ~ 176 个氨基酸在膜外。ProtScale 分析表明, 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。

根据 PROSITE 分析显示, 该序列存在 2 个 EF-hand Ca²⁺ 结合结构域, 分别为 DLNDDKLISPEE (98 - 109) 和 DTNGDDKLDGEE

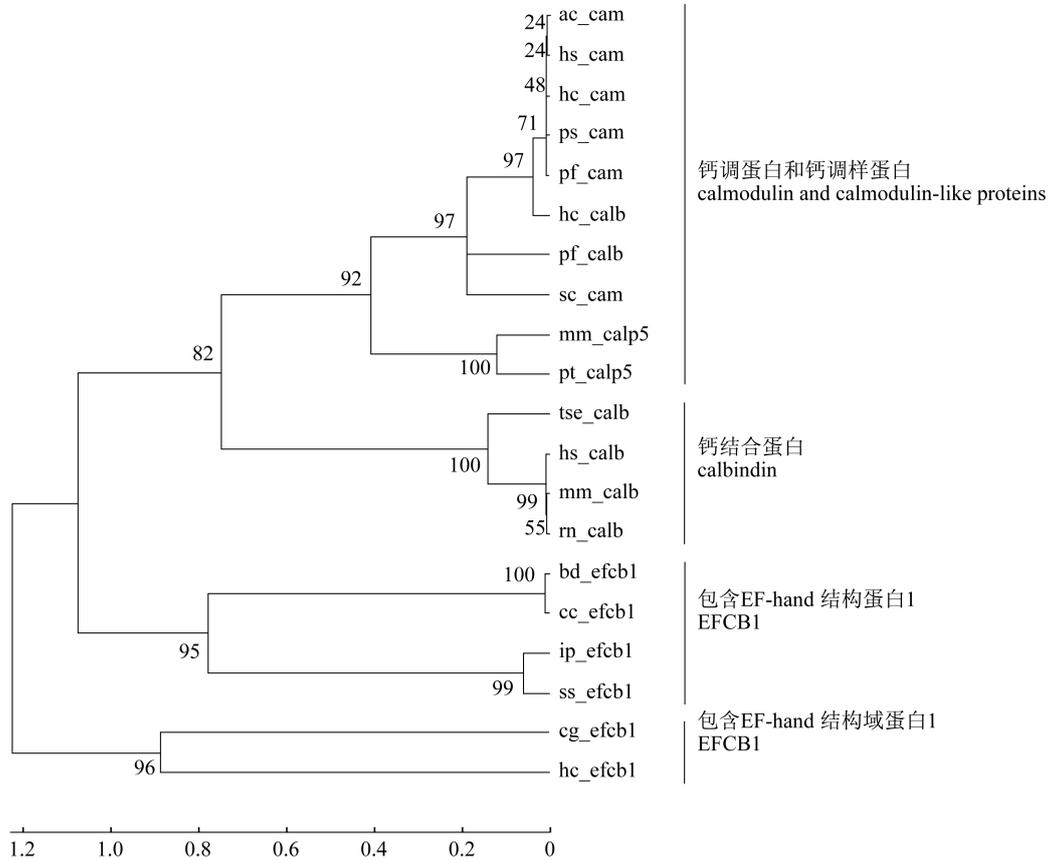


图3 三角帆蚌 EFCB1 和其他物种包含 EF-hand 结构域基因氨基酸序列系统进化树

在分支上都标明了 Bootstrap 值；图中标尺表明分支间的变化数；蛋白名称同图 2 注释

Fig.3 A phylogenetic tree analysis of *H. cumingii* EFCB1 and the EF-hand signatures of genes from other species

Bootstrap values are shown at the branch points; scale bar indicates the number of changes inferred as having occurred along each branch; the abbreviations of protein names are the same as Fig. 2

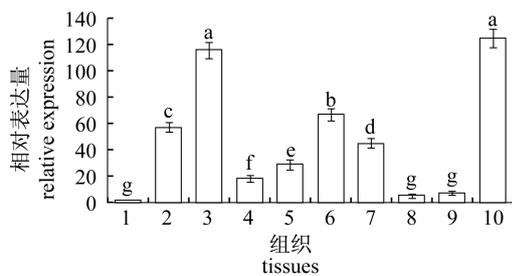


图4 三角帆蚌 EFCB1 基因组织差异表达分析

1. 肾脏, 2. 外套膜, 3. 鳃, 4. 内脏团, 5. 闭壳肌, 6. 斧足, 7. 性腺, 8. 血淋巴, 9. 肝脏, 10. 肠; 不同小写字母表示相对表达量存在显著差异。下同

Fig. 4 The tissues different of EFCB1 gene expression in *Hyriopsis cumingii*

1. kidney, 2. mantle, 3. gill, 4. visceral mass, 5. adductor muscle, 6. axe foot, 7. gonad, 8. haemolymph, 9. liver, 10. gut; different lowercases mean significant differences among relative expression; the same as the following

插核后不同时期 Q-PCR 结果显示, 三角帆蚌 EFCB1 基因 mRNA 在插核后不同时期的外套膜和内脏团育珠部位组织中均有表达。将同一时间点外套膜和内脏团中 EFCB1 基因表达量进行比较发现: 在对照组 (CK) 和插核后 3 个时期 (第 5、20 和 50 天) 2 个组织的表达量均具有显著差异 ($P < 0.05$), 且内脏团中表达量均低于外套膜; 在插核后第 90 天时, EFCB1 基因在 2 个组织中的表达差异不显著 ($P > 0.05$) (图 5)。

分别将 EFCB1 基因在外套膜和内脏团不同时期的表达量进行比较发现: EFCB1 基因在这 2 个组织中连续时间点的表达变化趋势一致。EFCB1 基因在插核后第 5 天与 CK 表达差异不显著 ($P > 0.05$); 插核后第 20 天表达量显著增加 ($P < 0.05$), 并达到了各时期的最大值; 插核后第 50 天表达量显著降低 ($P < 0.05$), 且降低到各时期

的最小值;插核后第 90 天表达量显著升高 ($P < 0.05$),整体呈先升高后降低再上升的趋势。除 CK 和插核后第 5 天,连续 2 个时间点之间外套膜和内脏团中的表达量均有显著差异(图 5)。

分别将 *EFCB1* 基因在外套膜和内脏团插核后不同时期的表达量与各组织对照组进行比较发现:*EFCB1* 基因在外套膜插核后第 5 天表达量与 CK 差异不显著 ($P > 0.05$);插核后第 20 天表达量显著高于 CK ($P < 0.05$);插核后第 50 和 90 天表达量显著低于 CK ($P < 0.05$)。 *EFCB1* 基因在内脏团插核后第 5 和 90 天与 CK 差异不显著 ($P > 0.05$);插核后第 20 和 50 天表达量显著低于 CK ($P < 0.05$) (图 5)。

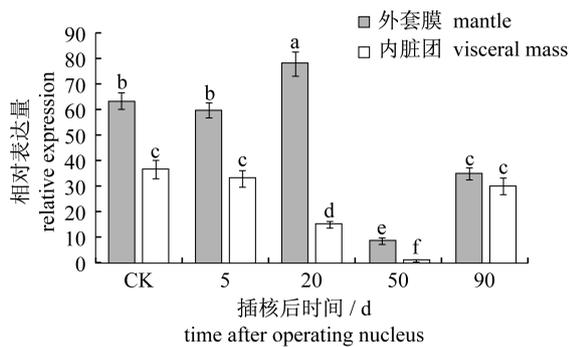


图 5 三角帆蚌 *EFCB1* 基因在插核后不同时期表达情况
Fig. 5 Expression levels of *EFCB1* gene at different time after operating pearl nucleus in *Hyriopsis cumingii*

3 讨论

本研究运用 RACE-PCR 技术,克隆得到了三角帆蚌 *EFCB1* 基因 cDNA 序列,全长 981 bp,其中开放阅读框为 531 bp,编码 176 个氨基酸残基。*EFCB1* 氨基酸序列存在一个跨膜区域,第 1~4 个氨基酸在膜内,第 5~23 个氨基酸在膜上,第 24~176 个氨基酸在膜外。ProtScale 分析表明,该序列大部分氨基酸属于亲水性氨基酸,属亲水蛋白。该蛋白存在 2 个 EF-hand Ca^{2+} 结合结构域,分别为 DLNDDKLISPEE (98 - 109) 和 DTNGDDKLDGEE (129 - 140)。2 个 EF-hand 模块均为 12 个氨基酸残基,且起始和终止氨基酸分别为天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)。典型的 EF-hand 结构域由 29 个氨基酸组成,基本功能结构域是一种螺旋-中央环-螺旋(helix-loop-helix)结构,通常成对出现^[18],其中序列保守的环通常由 12 个氨基酸残基组成,称为 EF-hand 模块,起

始和终止氨基酸一般分别为天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)^[3]。二级结构预测显示,三角帆蚌 *EFCB1* 只有 EF2 结构域两侧是 α 螺旋,EF1 结构域只有环-螺旋结构。螺旋-中心环-螺旋结构通常是钙结合活性的标志,螺旋结构在提高 EF-hand 的 Ca^{2+} 亲和力方面起重要的作用,并且 α 螺旋疏水性的增强有利于加强蛋白质核心的稳定性^[19]。*EFCB1* 的 EF1 结构域明显缺少一个 α 螺旋,推测其 Ca^{2+} 亲和力较低。由于 EF-hand 结构具有很强的成对倾向,因此含有单数 EF-hand 结构的蛋白是非常罕见的。单个具有功能的 EF-hand 结构域在电压门控 Ca^{2+} 通道 1.2 亚基的 C 端结构域被发现,这个结构域被认为能够结合二价离子且对于维持 Ca^{2+} 的动态平衡具有重要的作用^[20]。

组织表达分析表明,三角帆蚌 *EFCB1* 基因在外套膜、鳃、内脏团、闭壳肌、斧足、性腺、肾脏、血淋巴、肝脏和肠中均有表达,其中肠和鳃中表达量显著高于其他各组织 ($P < 0.05$),斧足、外套膜、性腺、闭壳肌、内脏团次之,且各组织间表达量存在显著差异 ($P < 0.05$),血淋巴、肝脏和肾脏中表达水平相对较低。珍珠形成是一个复杂的 Ca^{2+} 代谢过程, Ca^{2+} 首先通过鳃和肠吸收进而将 Ca^{2+} 运送到外套膜等组织中^[20-22]。在外套膜和内脏团组织中 Ca^{2+} 通过基质蛋白引导形成规则的晶体结构^[23]。软体动物发育和珍珠形成过程中钙代谢过程由各个组织及细胞严格调控^[24]。荧光定量 PCR 结果显示 *EFCB1* 在鳃和肠中表达较高,这说明 *EFCB1* 蛋白可能在珍珠和贝壳形成中对 Ca^{2+} 的从水体向组织内的吸收和转运过程发挥作用。李文娟等^[25] 利用激光共聚焦技术发现三角帆蚌外套膜中 Ca^{2+} 荧光强度最大,育珠期外套膜细胞内 Ca^{2+} 荧光强度显著高于非育珠期,表明外套膜具有吸收和贮存的作用。另一方面,经蛋白跨膜结构分析结果表明,该蛋白是一个膜蛋白,通常膜蛋白与离子的吸收相关,结合组织表达分析中鳃和肠内表达较高的结果,更加有力说明该蛋白在 Ca^{2+} 吸收过程中起重要作用。

研究资料表明,三角帆蚌育珠过程中 Ca^{2+} 的代谢水平具有波动性^[26-27],而本研究发现 *EFCB1* 基因表达在其插核后不同时期也具有起伏变化的特点,这暗示了该基因可能是珍珠形成过程中一个重要的调节因子。有文献表明,三角帆蚌在插核后第 20 天时,次级珍珠囊基本形成,

此时珍珠质开始沉积,钙代谢变得活跃起来^[26-27],这与本研究外套膜中 *EFCB1* 基因表达量在插核后第 20 天逐渐升高的结果一致。而内脏团插核后该基因表达量在第 20 天时显著降低,这可能与插核手术影响三角帆蚌机体代谢有关。研究表明三角帆蚌进行内脏团插核手术后,伤口的修复需要一个愈合过程(插核后 20 天内)^[28],在该时期内三角帆蚌非特异性免疫系统增强,免疫活性高,而 *EFCB1* 基因在机体内的表达受到显著影响,表达量下降^[29-31],这与本研究该基因在内脏团插核后的表达趋势一致。随着插核时间的延长,珍珠囊结构逐步发育成熟,伴随珍珠囊的形成,越来越多的 Ca^{2+} 被快速沉积下来,形成结晶^[25],而后体内 Ca^{2+} 代谢水平下降,打破了体内的钙稳态,从而促进了机体各水平对 Ca^{2+} 代谢的调控作用^[32]。本研究发现三角帆蚌 *EFCB1* 基因表达在插核后第 50 天显著下调可能与该生物过程有关,而在第 90 天时 *EFCB1* 表达量的显著升高是体内钙稳态的调节回升促进了该基因的表达。但是,对于 *EFCB1* 基因与三角帆蚌体内 Ca^{2+} 代谢间的具体关系仍需进一步探索和验证。

综上所述,三角帆蚌 *EFCB1* 基因在鳃和肠中显著表达,参与调节 Ca^{2+} 的吸收,进而调控珍珠形成过程中的钙代谢过程。在插核后不同时期珍珠形成过程中表达量有所变化,说明该蛋白参与钙代谢生物矿化过程,暗示了该蛋白在珍珠形成过程中发挥作用。至于 *EFCB1* 蛋白在外套膜和内脏团中的差异表达是否导致这 2 个育珠部位所产珍珠质量有所差异,并且 *EFCB1* 基因在珍珠形成过程中的具体调控作用还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Machado J, Lopes L M. Calcification mechanism in freshwater mussels; potential targets for cadmium [J]. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 2011, 93: 1778 - 1787.
- [2] Delany A M, Kalajzic I, Bradshaw A D, et al. Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival [J]. *Endocrinology*, 2003, 144: 2588 - 2596.
- [3] Tu Q, Pi M, Quarles L D. Calcyclin mediates serum response element (SRE) activation by an osteoblastic extracellular cation-sensing mechanism [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2003, 18: 1825 - 1833.
- [4] Duarte W R, Shibata T, Takahashi K. S100A4: A novel negative regulator of mineralization and osteoblast differentiation [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2003, 18: 493 - 501.
- [5] Bellido T, Huening M, Raval-Pandya M, et al. Calbindin-D28k is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 26328 - 26332.
- [6] Ren G, Hu X, Tang J, et al. Characterization of cDNAs for calmodulin and calmodulin-like protein in the freshwater mussel *Hyriopsis cumingii*; Differential expression in response to environmental Ca^{2+} and calcium binding of recombinant proteins [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2013, 165 (3): 165 - 171.
- [7] Bellido T, Huening M, Raval-Pandya M, et al. Calbindin-D28k is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (34): 26328 - 26332.
- [8] Mikael W, Yngve S, Tomas B, et al. Isolation, characterization, and primary structure of a calcium-binding 63-kDa bone protein [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (17): 6125 - 6133.
- [9] Li W J, Li Q, Qi X X, et al. Sequence clone of cDNA and gene expression of calmodulin in *Hyriopsis cumingii* [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2014, 42 (22): 7310 - 7314. [李文娟, 李倩, 祁晓翔, 等. 三角帆蚌钙调蛋白 CaM 基因的 cDNA 序列克隆与表达分析. *安徽农业科学*, 2014, 42 (22): 7310 - 7314.]
- [10] Li S, Xie L, Zhang C, et al. Cloning and expression of a pivotal calcium metabolism regulator: Calmodulin involved in shell formation from pearl oyster (*Pinctada fucata*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2004, 138 (3): 235 - 243.
- [11] Li S, Xie L, Zhang R. cDNA cloning and characterization of a novel calmodulin-like protein from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. *Federation of European Biochemical Societies*, 2005, 272 (19): 4899 - 4910.
- [12] Li C, Huang J, Li S, et al. Cloning, characterization and immunolocalization of two subunits of calcineurin from pearl oyster (*Pinctada fucata*) [J].

- Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 2009, 153 (1): 43 - 53.
- [13] Li J L, Qian R H, Bao B L, *et al.* RAPD analysis on genetic diversity among the stocks of *Hyriopsis cumingii* from the five large lakes of China [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2005, 14 (1): 1 - 5. [李家乐, 钱荣华, 鲍宝龙, 等. 中国五大湖三角帆蚌群体遗传多样性的 RAPD 分析. 上海水产大学学报, 2005, 14(1): 1 - 5.]
- [14] Li W J, Shi Z Y, He X J. Study on immune regulation in *Hyriopsis cumingii* Lea: Effect of pearl-nucleus insertion in the visceral mass on immune factors present in the hemolymph [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(6): 789 - 794.
- [15] Bai Z Y, Zheng H F, Lin J Y, *et al.* Comparative analysis of the transcriptome in tissues secreting purple and white nacre in the pearl mussel *Hyriopsis cumingii* [J]. PloS One, 2013, 8(1): e53617.
- [16] Lewit A, Bentley S R. EF-hand calcium-binding proteins [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2000, 10: 637 - 643.
- [17] McPhalen C A, Strynadka N C, James M N. Calcium-binding sites in proteins: A structural perspective [M] // Anfinsen C B, Edsall J T, Eisenberg D S, *et al.* Advances in Protein Chemistry. New York: Academic Press, 1991: 77 - 144.
- [18] Kragelund B B, Jonsson M, Bifulco G, *et al.* Hydrophobic core substitutions in calbindin D9k: Effects on Ca^{2+} binding and dissociation [J]. Biochemistry, 1998, 37(25): 8926 - 8933.
- [19] Bruner S, Scheuer T, Kleivit R, *et al.* Modulation of Ca V1.2 channels by Mg^{2+} acting at an EF-hand motif in the COOH-terminal domain [J]. The Journal of General Physiology, 2005, 126(4): 311 - 323.
- [20] Wilbur K M. Shell formation [M]. New York: Academic Press, 1983.
- [21] Simkiss K W. Biomineralization: Cell biology and mineral deposition [M]. New York: Academic Press, 1989.
- [22] Mount A S, Paradkar R P. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster [J]. Science, 2004, 304: 297 - 300.
- [23] Addadi D J, Nudelman F. Mollusk shell formation: A source of new concepts for understanding biomineralization processes [J]. Chemistry, 2006, 12: 980 - 987.
- [24] Rousseau M, Wan G. Biomineralisation markers during a phase of active growth in *Pinctada margaritifera*. [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2003, 135: 271 - 278.
- [25] Li W J, Shi Z Y, Hao Y Y, *et al.* Study of Ca^{2+} deposition and distribution in cells from different tissues with laser scanning confocal microscopy in *Hyriopsis cumingii* [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(2): 214 - 218. [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与分布. 水产学报, 2011, 35(2): 214 - 218.]
- [26] Luo W, Yang S B, Ding Y, *et al.* Calcium metabolism in *Hyriopsis cumingii* during early pearl-forming stages [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(6): 895 - 900. [罗文, 杨受保, 丁盈, 等. 三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 珍珠形成初期钙代谢的特征分析. 海洋与湖沼, 2010, 41(6): 895 - 900.]
- [27] Shi A J, Zhang M, Wu Z W, *et al.* On the formation of pearl sac in freshwater mussel [J]. Journal of Fisheries of China, 1985, 9(3): 247 - 253. [石安静, 张矛, 吴中文, 等. 三角帆蚌珍珠囊形成的研究. 水产学报. 1985, 9(8): 247 - 253.]
- [28] Shi Z Y, Yang X X, Chen X W, *et al.* Full-length cDNA cloning and expression characterization of alpha-2 macroglobulin from *Hyriopsis cumingii* [J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(4): 526 - 532. [施志仪, 杨显祥, 陈晓武, 等. 三角帆蚌 alpha-2 巨球蛋白 cDNA 全长的克隆及表达特征. 水产学报, 2008, 32(2): 526 - 532.]
- [29] He X J, Shi Z Y, Chen X W, *et al.* Effect pearl-nucleus-inserting operation in visceral mass on haemocytes in *Hyriopsis cumingii* Lea [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(2): 410 - 417. [何秀娟, 施志仪, 陈晓武, 等. 内脏团插核术刺激对三角帆蚌血细胞的影响. 水生生物学报, 2010, 34(2): 410 - 417.]
- [30] He X J, Shi Z Y, Li W J. Effects of pearl-nucleus-inserting operation on three immune factors in *Hyriopsis cumingii* Lea [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(6): 859 - 867. [何秀娟, 施志仪, 李文娟. 插核手术对三角帆蚌血淋巴中 3 种免疫防御因子的影响. 中国水产科学, 2009, 16(6): 859 - 867.]
- [31] Xu Q G, Xie J. Relationship between quality of pearl cultured in the triangle mussel *Hyriopsis cumingii* of different ages and its immune mechanism [J].

Aquaculture, 2010, 315(3-4):196-200.
 [32] Qian W P, Lin G X, Xu Z R. The study of Ca^{2+} sedimentary effect in *Hyriopsis cumingii* [J].

Reservoir Fisheries, 2005, 25(137):6-9. [钱伟平, 林国星, 许梓荣. Ca^{2+} 在三角帆蚌体内沉积效应的研究. 水利渔业, 2005, 25(137):6-9.]

Molecular cloning and expression research of *EFCB1* cDNA in *Hyriopsis cumingii*

QI Xiaoxiang¹, LI Wenjuan¹, SHANG Chao¹, ZHOU Zirui¹, SHANG Pan¹, SHI Zhiyi^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Researches and Aquacultural Ecology Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China;

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

Abstract: In order to find more functional genes with EF-hand domain in *Hyriopsis cumingii*, we cloned the full-length cDNA of EF-hand calcium-binding domain-containing protein 1 (*EFCB1*) by using RACE-PCR technique, and performed bioinformatics analysis; *EFCB1* gene expression levels were analyzed in different tissues from *Hyriopsis cumingii* (mantle pallial, gill, visceral mass, adductor muscle, axe foot, gonad, liver, gut, haemolymph and kidney) and in different periods of the mantle and visceral mass after inserting nucleus. The results showed that the *EFCB1* cDNA sequence length was 981 bp, containing a 531 bp open reading frame (ORF) encoding 176 amino acid residues, 239 bp 5'-untranslated region (UTR) and 211 bp 3'-UTR. The molecular weight of the peptide was predicted 19.9 ku, with an isoelectric point of 4.70. Amino acid sequence analysis showed that there was a transmembrane region. Results of the ProtScale online analysis showed that the protein was hydrophilic protein. There were two typical EF-hand calcium binding domains, respectively DLNDDKLISPEE (98-109) and DTNGDDKLDGEE (129-140). Phylogenetic analysis indicated that the *EFCB1* of *H. cumingii* was closely related to seawater bivalve *Crassostrea gigas*, followed by that of fish and then insect. Real-time Q-PCR results showed that the *EFCB1* mRNA is ubiquitously expressed in various tissues (mantle pallial, gill, visceral mass, adductor muscle, axe foot, gonad, liver and gut), with the highest level in the gut and gill ($P < 0.05$), and it is also highly expressed in the pearl culture tissues (mantle and visceral mass). These data suggested that *EFCB1* plays an important role in the absorption process of Ca^{2+} , and there might be an intrinsic relationship between *EFCB1* and pearl formation of *H. cumingii*. Furthermore, expression differences were found among different periods of the mantle and visceral mass after inserting nucleus in the *H. cumingii*, and the expression level of *EFCB1* in the mantle was significantly higher than that in visceral mass ($P < 0.05$), after nucleus inserted 20 d it was significantly higher than other periods ($P < 0.05$), suggesting *EFCB1* has an important function in the formation process of pearl sac and nacre secretion, indicating *EFCB1* might be an important regulator of pearl formation. The results of present study may provide useful information for further studies on regulation mechanism of calcium metabolism and pearl formation.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; *EFCB1*; EF-hand domain; nucleated pearl; gene expression

Corresponding author: SHI Zhiyi. E-mail: zyshi@shou.edu.cn