

文蛤粪卟啉原Ⅲ氧化酶基因克隆及与壳色性状的相关性分析

詹艳玲¹, 董迎辉¹, 何琳^{1*}, 阮文斌², 高晓艳¹, 林志华¹

(1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室, 浙江 宁波 315100;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 粪卟啉原Ⅲ氧化酶(coproporphyrinogen-III oxidase, CPOX)是卟啉类化合物合成过程中的关键酶, 而卟啉是形成机体色素的重要化合物。采用RACE方法克隆获得文蛤粪卟啉原Ⅲ氧化酶基因(*MmCPOX*)的cDNA序列, 该序列全长1490 bp, 其中开放阅读框1173 bp, 编码390个氨基酸, 预测分子量为12.04 ku, 理论等电点为5.05; 预测该酶含有跨膜结构域和Coprogen-oxidase结构域; 从构建的系统进化树来看, 软体动物门的文蛤、加州海兔和太平洋牡蛎首先聚在一起, 显示出较近的亲缘关系。qRT-PCR结果显示, *MmCPOX*基因在文蛤早期发育的各个时期均有表达, 但在D形幼虫期以后表达量显著升高; 在文蛤成贝的7个组织中, 外套膜和血液中表达量显著高于其他组织, 表明其与血卟啉合成和壳色卟啉形成相关; 在不同壳色文蛤中, 红壳文蛤、暗纹文蛤、细纹文蛤的外套膜中表达量显著高于黑斑文蛤和白壳文蛤, 表明其参与形成红色和褐色壳色。

关键词: 文蛤; 粪卟啉原Ⅲ氧化酶; 壳色; 克隆与表达

中图分类号: Q 785; S 968.3

文献标志码: A

卟啉类化合物是广泛存在于生物体内的一类色素, 哺乳动物红细胞中的血红素、某些软体动物体内的血蓝素、双壳贝类壳表的色素等物质都具有卟啉或者类卟啉的骨架。粪卟啉原Ⅲ氧化酶是合成卟啉类物质过程中的关键酶, 能够催化其底物粪卟啉原Ⅲ生成粪卟啉原Ⅳ, 进而生成原卟啉Ⅳ, 最后最终生成卟啉。有研究表明, 卟啉类物质是决定贝类壳色的主要因素之一^[1], 而多数贝类壳色是可遗传的性状且与生长、存活、抗逆性等重要经济性性状显著相关^[2-5]。因此系统研究色素代谢相关基因、深入解析壳色形成机理具有重要的理论意义和实际应用价值。

文蛤(*Meretrix meretrix*)肉质细嫩、口味鲜美, 具有很高的营养价值和经济价值, 是我国沿海滩涂养殖的主要经济贝类, 也是大宗出口

创汇的重要鲜活水产品之一。文蛤的壳色和壳面花纹多种多样, 而壳色花纹漂亮的文蛤商品价格显著提升。已有研究发现, 文蛤的一些壳色花纹可以稳定遗传^[6], 且与生长、营养价值密切相关^[7], 这为壳色遗传研究和壳色新品种开发提供了重要思路, 然而目前有关文蛤壳色相关基因的研究尚未见报道。本实验首次克隆获得文蛤粪卟啉原Ⅲ氧化酶基因的cDNA全长, 并研究了该基因表达与壳色性状的相关性, 旨在为文蛤壳色形成机制研究和分子辅助育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用文蛤于2014年6月取自宁波象山县东盛水产养殖有限公司。挑选壳色花纹典型、活

收稿日期: 2015-08-23 修回日期: 2015-11-26

资助项目: 国家现代贝类产业技术体系专项(CARS-48); 浙江省自然科学基金(Y16C190015); 江苏省苏北科技专项(BN2015059); 宁波市科技计划项目(2016C70002)

通信作者: 何琳, E-mail: hlwithyou@qq.com

力旺盛的5种壳色文蛤(红壳文蛤、白壳文蛤、黑斑文蛤、暗纹文蛤、细纹文蛤)各4颗, 活体解剖取自外套膜边缘组织, 并取红壳文蛤的内脏团、血液、闭壳肌、足、鳃和水管组织, 所有样品经液氮速冻后存于-80 °C冰箱备用。

通过亲贝催产、人工授精和早期培育, 获得文蛤不同发育时期的样品。利用显微镜跟踪观察受精发育进程, 用过滤、离心方法获得未受精卵、受精卵、4细胞、囊胚、原肠胚、担轮幼虫、D形幼虫、壳顶幼虫、眼点幼虫及稚贝(10日龄)10个发育时期的样品。所有样品用液氮速冻, -80 °C保存。

PMD-18T和大肠杆菌(*Escherachia coli*) DH5 α 均由本实验室保藏, 其中PMD-18T购自TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司公司, 试剂盒SMART RACE和Advantage 2 Polymerase均购自Clontech公司, 割胶回收试剂盒购自TIANGEN, Taq Master-Mix购自北京康为世纪生物科技有限公司, 引物由上海生工有限公司合成。

1.2 实验方法

*MmCPOX*基因cDNA全长的克隆 用Trizol法提取红壳文蛤外套膜中的总RNA, NanoVue超微量紫外分光光度计检测RNA的浓度和纯度, 用1%的琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。利用试剂盒SMART RACE合成cDNA第一链, 同时根据文蛤转录组文库的注释信息, 检索到*MmCPOX*基因的EST片段, 并以此为模板设计引物CO I -F和CO I -R(表1), 以文蛤外套膜组织的cDNA为模板进行PCR扩增, 所用试剂盒为Advantage 2 Polymerase。

利用Touch Down PCR方法, 分别进行5'-RACE和3'-RACE的扩增, 产物使用1%琼脂糖凝

胶电泳进行检测, 并使用胶回收试剂盒对较亮的电泳条带进行回收纯化。纯化后的产物与PMD-18T载体连接过夜, 然后转化到大肠杆菌DH5 α 中进行克隆。最后通过菌液PCR检测转化结果, 选取阳性克隆, 送上海生工有限公司测序。

*MmCPOX*基因的生物信息学分析 测序拼接后的序列通过美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行同源搜索和功能域推导; ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)程序进行开放阅读框搜索; DNAMAN软件推测其编码的氨基酸序列。利用在线DNA和蛋白序列处理工具SMS (<http://www.91bio.com/SMS2/>)推测出蛋白质的理化性质; 用ExPASy ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)在线工具对其编码的蛋白进行疏水性分析; 运用SignalP 4.1 Serve (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)预测该蛋白的信号肽。在CBS Prediction Servers网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)上, 用TMHMM进行蛋白质跨膜分析; N-连接和O-连接的糖基化位点分别通过NetNGlyc 4.0 Server和NetOGlyc 1.0 Server程序分析获得。Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>)软件对蛋白质高级结构进行预测。

根据推导出的*MmCPOX*基因编码的氨基酸序列, 利用NCBI Blastx下载获得其他物种的CPOX氨基酸序列, 用ClustalW软件对其进行氨基酸序列比对, 用MEGA 6.0软件的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树。

*MmCPOX*基因在不同发育时期、不同组织以及不同壳色外套膜组织中的表达分析 用Trizol法提取文蛤10个发育时期样品、7个成贝组织及5种壳色文蛤外套膜组织的总RNA。根据

表 1 实验所用的引物及序列

Tab. 1 Primers and their sequences used in this experiment

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
CO I -F	CTCGCAAATGGCTTGCTCACTTACC	3'-RACE扩增
CO I -R	CCTCTCCAAGTGCTCGCAAAAATC	5'-RACE扩增
Real- <i>MmCPOX</i> -F	AAACTTTTTAGTAGGTTGAGGTA	荧光定量基因引物
Real- <i>MmCPOX</i> -R	ATCTATCCACAATCCACTTCTTA	荧光定量基因引物
18 s-F	CTTTCAAATGCTGCGCCATCAACT	荧光定量内参引物
18 s-R	AGTGACGAAAAATAACAATACGGGA	荧光定量内参引物

Promega反转录试剂盒说明进行cDNA的合成,作为实时荧光定量PCR检测的模板。基于已克隆到的*MmCPOX*基因的表达序列,设计合成荧光定量引物Real-*MmCPOX*-F和Real-*MmCPOX*-R(表1),以18S rRNA为内参基因进行相对定量。PCR反应体系为20 μ L,包含SYBR Green Mix (Bio-rad) 10 μ L, cDNA模板0.8 μ L,上下游特异性引物(10 mmol/L)各1 μ L,以DEPC-H₂O补足。使用ABI 7500 fast荧光定量PCR仪进行扩增,具体反应程序:95 $^{\circ}$ C预变性20 s,然后进行40个循环:95 $^{\circ}$ C变性3 s,60 $^{\circ}$ C退火15 s,72 $^{\circ}$ C延伸10 s。每个组织、发育时期样品设3个平行,基因的相对mRNA水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算,结果用平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)表示,采用SPSS 20.0进行One-Way ANOVA单因素方差分析, $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 极显著差异。

2 结果

2.1 *MmCPOX*基因全长序列分析

克隆所得到的*MmCPOX*基因cDNA全长1490 bp (GenBank登录号: KU095865),其中ORF为1173 bp,编码390 aa,5'UTR长93 bp,3'UTR为227 bp(图1)。预测的分子量为12.04 ku,理论等电点为5.05。结合Expasy Protscale软件和SMART软件预测结果,该蛋白质在氨基酸组成上,非极性氨基酸所占比例较高,且氨基酸序列中含有跨膜结构域,表现为疏水性。利用TMHMM在线软件分析亦可得出,在预测的氨基酸序列靠近细胞膜内侧的位置含有一个跨膜结构域。Expasy SignalP软件预测显示,该蛋白质没有明显的信号肽结构。

2.2 *MmCPOX*基因氨基酸序列的预测分析

*MmCPOX*的功能域分析结果发现,该酶含有两个功能域:跨膜结构域和Coprogen-oxidase结构域(图2)。二级结构预测显示,*MmCPOX*蛋白含有H键229个、 α -螺旋14个、 β -折叠11个、 γ -转角26个(图3)。

2.3 *MmCPOX*基因氨基酸序列同源性及系统进化分析

通过NCBI找出与文蛤同属于贝类的加州海兔(*Aplysia californica*, AAP34327.1)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*, EKC32626.1)以及其他物种的CPOX氨基酸序列,利用MEGA 6.0软件的NJ法构

建系统进化树(图4),同时进行氨基酸多序列比对(图5)。从NJ法构建的系统进化树来看,软体动物门的文蛤、加州海兔和太平洋牡蛎亲缘关系较近,首先聚在一起;而昆虫纲的7个物种单独聚成一支,显示出较近的亲缘关系,而与其他种类差异明显。

2.4 *MmCPOX*基因在文蛤不同发育时期、不同组织、不同壳色个体外套膜组织中的表达差异性分析

利用qRT-PCR技术,对*MmCPOX*基因在不同发育时期、不同组织、不同壳色文蛤外套膜组织的表达差异进行分析。结果表明,在文蛤发育的不同时期,*MmCPOX*基因从D形幼虫时期开始有显著性表达,且有逐渐升高的趋势($P < 0.01$)(图6)。*MmCPOX*基因在文蛤的足、外套膜、水管、闭壳肌、鳃、内脏团和血液中均有表达,但在血液和外套膜中的表达量极显著高于其他组织($P < 0.01$)(图7),表明其与血卟啉合成和壳色卟啉形成相关。*MmCPOX*基因在红壳文蛤、黑斑文蛤、暗纹文蛤、细纹文蛤、白壳文蛤外套膜中均有表达,但在红壳文蛤、暗纹文蛤、细纹文蛤中的表达量显著高于黑斑文蛤、白壳文蛤中的表达量($P < 0.05$)(图8),说明其参与形成红色和褐色壳色。

3 讨论

粪卟啉原Ⅲ氧化酶由于参与了高等动物血红素的合成而引起人们广泛关注,有关其基因的克隆已在人、太行山猕猴、小鼠等多种动物中有过报道^[8]。Lee等^[9]还利用X射线晶体学技术分析了CPOX的分子结构,并研究了基因突变如何干扰血红素的合成从而导致紫质症的发生。然而,CPOX基因在较低等的贝类中,仅在加州海兔^[10]和太平洋牡蛎^[11]中有过报道。本实验克隆获得了文蛤*MmCPOX*基因的cDNA全长1490 bp,分析可知其ORF长度为1173 bp,编码390个氨基酸,与加州海兔CPOX基因编码390个氨基酸^[12]和太平洋牡蛎CPOX基因编码394个氨基酸^[10]差异不大。CPOX基因氨基酸序列比对和系统进化树分析结果表明,文蛤CPOX与同为贝类的加州海兔、太平洋牡蛎的亲缘关系较近,与其他脊椎动物和无脊椎动物的序列相似度也较高,这表明该蛋白在各物种间有较大差异,但是仍保留

```

1  ACATGGGGGTACGTGATGATACGTCCATCACCGGCGATTTGACATTTAAGTTGAATCACA
61  AGTTTTAGATGCATCTAATTGATTTTTGACATTATGACACATGTAATAAACTTTTTAGT
1  M T H V N K L F S
121 AGGTTGAGGTATTTCAGAACAATTTCAACGCTTGCATTATTCCAGACAAGACACAAAAAA
10  R L R Y F R T I S T L A L F Q T R H K K
181 GCAGGATGGAGAGTGGTGTTCGAGCAGCTGGTCTATCTACTGCATGTGTTGCTACAGTG
30  A G W R V V F A A A G L S T A C V A T V
241 TTCTGCAAGAAAAATAAAGTGTTCGAGCAACCATGCCGAAATACTGGATGGCAGAACCT
50  F C K K N K V F A A T M P K Y W M A E P
301 ATAACAGATATGGCTGAAATAGAGAAGAACTCTGACTCTATGAGAATAAAGATGGAGAAA
70  I T D M A E I E K N S D S M R I K M E K
361 ATGATCATGGACATGCAGGCAGATTTTGCAGCACTTGGAGAGGAAGAAGATCAAGAA
90  M I M D M Q A D F C R A L G E E E D Q E
421 GGAGATGGTAAGAAGTGGATTGTGGATAGATGGGAGCGAAAGGAGGGAGGAGGTGGGATA
110  G D G K K W I V D R W E R K E G G G G I
481 TCTTGTGTGATACAGGATGGTAGAGTATTTGAGAAGGCAGGTGTGAACATCTCTGTTGTC
130  S C V I Q D G R V F E K A G V N I S V V
541 ACTGGTAAACTTCCATATGCAGCTATACAGGGAATGAGGTCCAGAGGGAAATGTATAGAA
150  T G K L P Y A A I Q G M R S R G K C I E
601 GGAGATAATCTGCCATTCTTTCAGCTGGGATTAGTTCAGTAATTCATCCTAGAAATCCA
170  G D N L P F F A A G I S S V I H P R N P
661 AATGTCCCAACCATACTTCAACTACAGATATTTGAATTAACAGACAAAACCTGGCAAG
190  N V P T I H F N Y R Y F E L T D K T G K
721 GAACACTGGTGGTGGTGGAGGTGGAAGTATCTGACACCATACTTCCCTTGATGAAGAGGAT
210  E H W W F G G G T D L T P Y F L D E E D
781 GTTGTTCATTTTACAAGACACTGAAGACAGCATGTGACAAAACATGACAAAAGTTACTAC
230  V V H F H K T L K T A C D K H D K S Y Y
841 CCTAAGTTTAAGGCTTGGTGCATCGTTACTTCTACATCAAACATAGAGGACAGACTCGT
250  P K F K A W C D R Y F Y I K H R G Q T R
901 GGTGTTGGTGGTATTTTCTTGGATGATATGGATGACCGCTCACCAGAGGATATGTTCCAG
270  G V G G I F F D D M D D R S P E D M F Q
961 TTTGTCAAAAACCTGTGCAGCTGCCGTGAAACCATCATACTTCCATTAGTGAAGAAAAAC
290  F V K T C A A A V K P S Y I P L V K K N
1021 AAGGATAAGGGATACTTTACAGTGACAGGAGATGGCAGTACTTAGGAGAGGGTACTAT
310  K D K G Y S Y S D R R W Q L L R R G Y Y
1081 GCTGAGTTCAACCTGGTTTATGACCGTGGGACAAAAGTTTGGTCTGAATACACCTGAGGCC
330  A E F N L V Y D R G T K F G L N T P E A
1141 AGAATTGAAAGCATTATGATGTCTCTGCCATTAATGCTAGCTGGGAGTACTGCCATGAG
350  R I E S I M M S L P L N A S W E Y C H E
1201 ATAAAGCCAGGGTCTCCAGAAAAGAAGCTTACAGATGTTCTCACTAATCCAAGGGAATGG
370  I K P G S P E K K L T D V L T N P R E W
1261 GTCTGATGACAGCGCCATCAATGACAGCGGTTGTGCCTTCGAGAAAACAAATCTGACAAAA
390  V *
1321 CAACTGTGTGTTCAAAAACCTGACAAAACAACATATGTTCAATTAATGTTGACAAAACAAC
1381 GTGTGTTCAAAAACCTGACAAAACAACATCTATGTGTTTCATAAATGTGACAAAACAACGTG
1441 TTCAAAACCTGACAAAACGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图1 *MmCPOX*基因全长cDNA序列及其推测的氨基酸序列

黑色阴影部分表示起始密码子、终止密码子、加尾信号, 划线部分表示跨膜结构域, 灰色阴影部分表示Coprogen-oxidase结构域

Fig. 1 The full-length of cDNA and deduced amino acid of *MmCPOX*

The black conserved domains are the start codon, stop codon and the polyadenylation signal sequence, the underline parts are the transmembrane region, and the grey conserved parts are the Coprogen-oxidase region

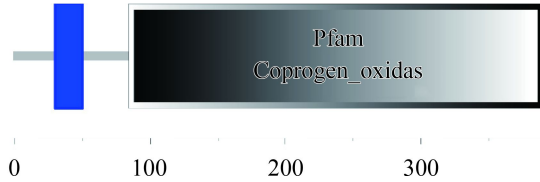


图2 MmCPOX蛋白功能域预测

Fig. 2 The prediction of the protein functional domains of MmCPOX

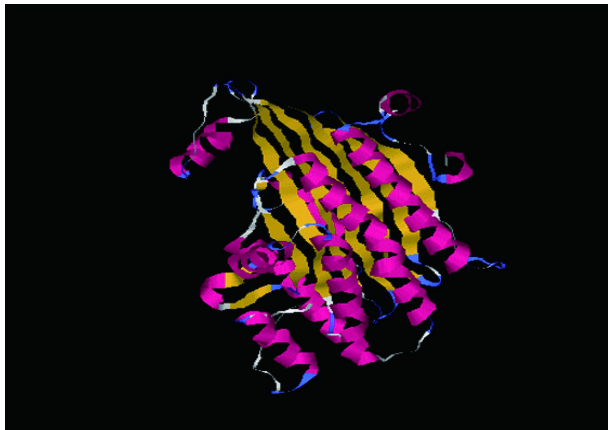


图3 MmCPOX蛋白的二级结构预测

红色为α-螺旋；黄色为β-折叠；蓝色为γ-转角；白色为其他残基

Fig. 3 The prediction of protein secondary structure of MmCPOX

The red represents the alpha-helix, yellow represents the beta sheet, blue represents the turn, other residues is white

了重要的结构特征，以维持其重要的生物学功能；氨基酸序列分析发现，在85~390的位置上有

一个Coprogen-oxidase结构域，该结构域是粪卟啉原氧化酶超家族中的保守序列^[11]，这对其发挥重要的生物学功能起着重要作用。

在动物细胞中，CPOX基因产生的粪卟啉原Ⅲ氧化酶能催化底物生成卟啉类物质，而卟啉类物质能够继续合成软体动物的血蓝素、哺乳动物的血色素、细胞色素C等^[13-16]。在斑马鱼(Danio rerio)中敲除CPOX基因会使血液变成无色透明液体而导致斑马鱼贫血，从而大大降低其成活率^[17]，由此可知该基因在动物血液形成和维持生命过程中发挥重要功能。本研究利用qRT-PCR技术发现MmCPOX基因在文蛤血液中的表达量最高，且极显著地高于除外套膜以外的其他5个组织(P<0.01)，这可能与其能催化合成血蓝素中的卟啉类物质密切相关。血液中的卟啉类物质能与铜离子结合生成血蓝素^[2, 15]，而血蓝素在软体动物中具有载氧、广谱抗菌以及凝血作用^[15]。故此推知，MmCPOX基因在文蛤血蓝素的合成中发挥重要作用。

Comfort等^[18]早在1951年就发现，卟啉类化合物是存在于双壳贝类中的一类色素；张刚生等^[19]用共聚焦激光拉曼光谱技术在企鹅珍珠贝(Peteria penguin)壳表检测到卟啉类物质的存在；孙家美等^[21]用X射线荧光光谱仪对多种贝壳的珍珠层进行了检测，发现卟啉类物质一般由有机色素和金属离子结合形成，可见卟啉与多种贝类的成色相关。卟啉类化合物一般以色蛋白的形式存在，很难与贝壳素分离^[18]，这为其结构的

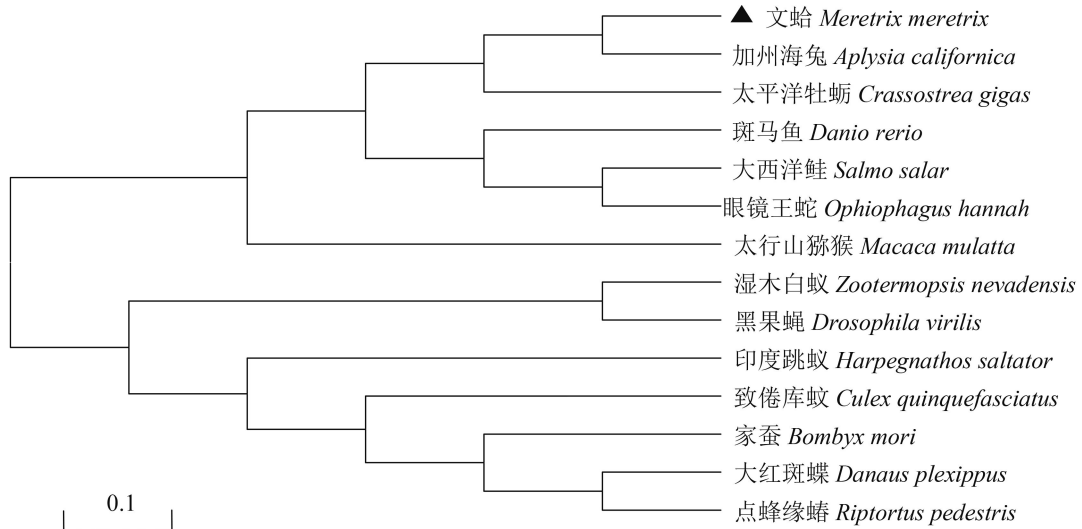


图4 基于MmCPOX氨基酸序列构建的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed with the amino acid sequence of MmCPOX

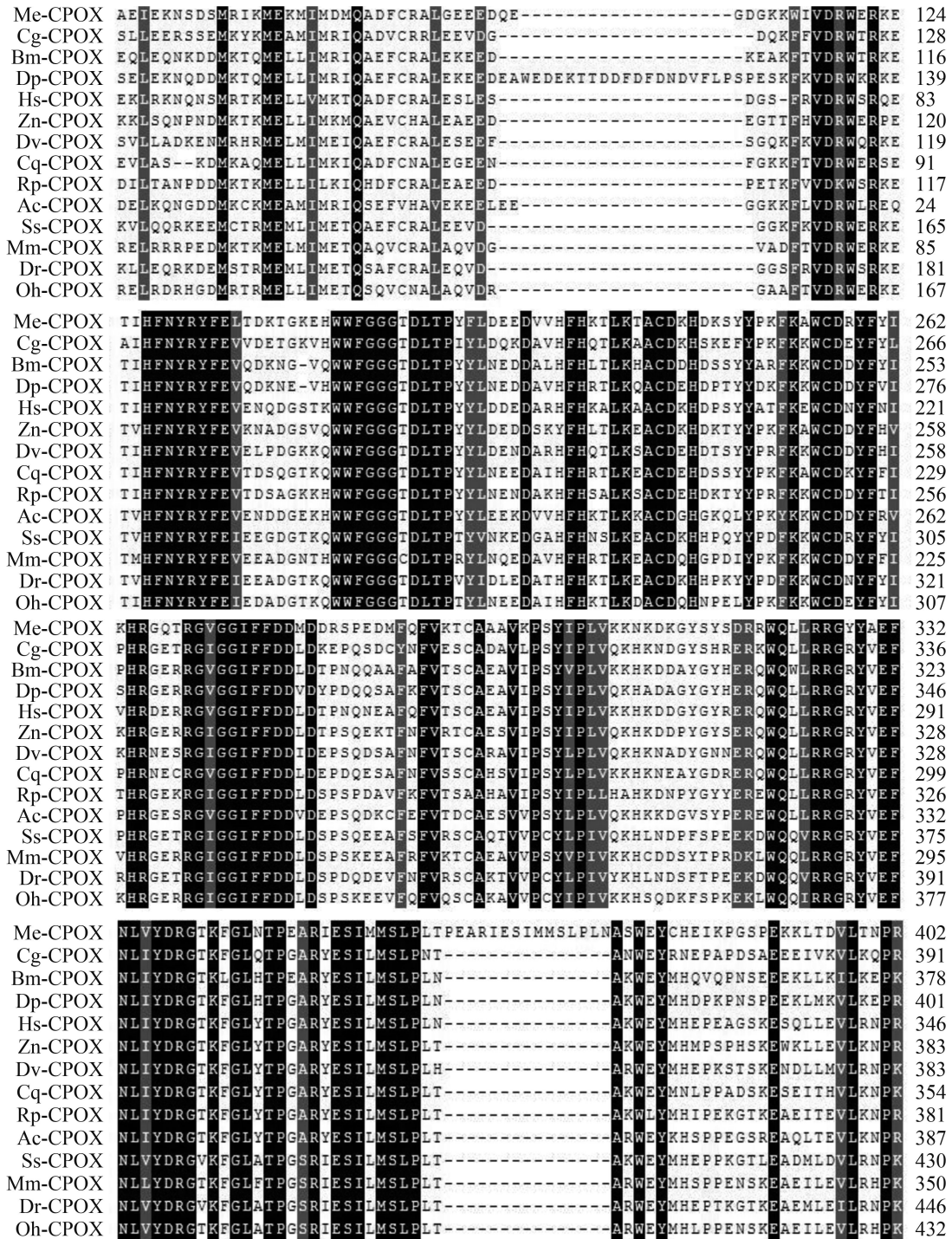


图5 文蛤与其他物种CPOX基因预测氨基酸序列的多序列比对

Me. 文蛤; Cg. 太平洋牡蛎; Bm. 家蚕; Dp. 大红斑蝶; Hs. 印度跳蚁; Zn. 湿木白蚁; Dv. 黑果蝇; Cq. 致倦库蚊; Rp. 点蜂缘蝽; Mm. 太行山猕猴; Dr. 斑马鱼; Oh. 眼镜王蛇

Fig. 5 Part of multiple sequence alignment of the deduced amino acid sequence of *MmCPOX* with other species

Me. *M. meretrix*; Cg. *Crassostrea gigas*; Bm. *Bombyx mori*; Dp. *Danaus plexippus*; Hs. *Harpegnathos saltator*; Zn. *Zootermopsis nevadensis*; Dv. *Drosophila virilis*; Cq. *Culex quinquefasciatus*; Rp. *Riptortus pedestris*; Ac. *Aplysia californica*; Ss. *Salmo salar*; Mm. *Macaca mulatta*; Dr. *Danio rerio*; Oh. *Ophiophagus Hannah*

准确鉴定造成了很大困难, 然而一些学者发现贝类色素的形成与外套膜直接相关, 通过检测

外套膜边缘膜中的色素可对壳表色素进行间接鉴定^[21-22]。在文蛤中, 已有研究发现外套膜细胞

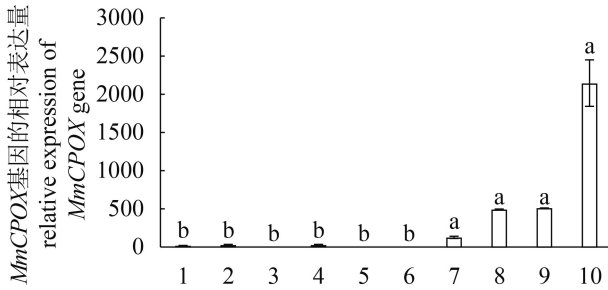


图6 *MmCPOX*基因不同发育时期的特异性表达($n>500$)

1. 未受精卵, 2. 受精卵, 3. 细胞期, 4. 囊胚, 5. 原肠胚, 6. 担轮幼虫, 7. D形幼虫, 8. 壳顶幼虫, 9. 眼点幼虫, 10. 稚贝(10日龄)。字母不同表示差异显著($P<0.01$), 下同

Fig. 6 Analysis of expression difference in different development stages of *MmCPOX* ($n>500$)

1. unfertilized mature eggs, 2. fertilized eggs, 3. cells period, 4. blastula, 5. gastrulae, 6. trochophore, 7. D-shaped larva, 8. umbo larvae, 9. larva, 10. juvenile (10 days). Different letters mean significant difference ($P<0.01$), the same below

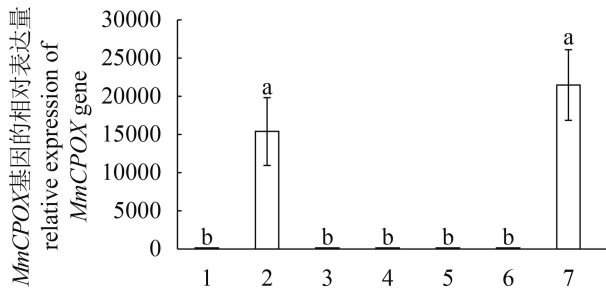


图7 *MmCPOX*基因在不同组织中的组织表达特征($n=4$)

1. 足, 2. 外套膜, 3. 水管, 4. 闭壳肌, 5. 鳃, 6. 内脏团, 7. 血液

Fig. 7 Tissue-specific expression of *MmCPOX* gene in different tissues ($n=4$)

1. foot, 2. mantle, 3. siphon, 4. adductor muscle, 5. gill, 6. digestive gland, 7. blood

由内外表皮、结缔组织、上皮组织组成, 其中上皮组织具有分泌和形成贝壳的功能, 外套膜边缘的色素细胞分泌的色素颗粒与贝壳表面形成的花纹和色泽有关^[23-28]。本研究发现 *MmCPOX* 基因在文蛤外套膜组织中表达量很高, 且在不同壳色外套膜组织中的表达有显著差异, 红壳、暗纹、细纹文蛤外套膜中的表达量显著高于黑斑和白壳文蛤 ($P<0.05$)。根据肉眼观察, 红壳、暗纹、细纹文蛤均呈现红褐色, 且红色程度不一, 而卟啉类物质能够形成黄色、粉红色、淡黄色或者褐色的贝壳颜色^[25, 27, 29], 不同壳色文蛤中 *MmCPOX* 基因的表达量与贝壳红色深

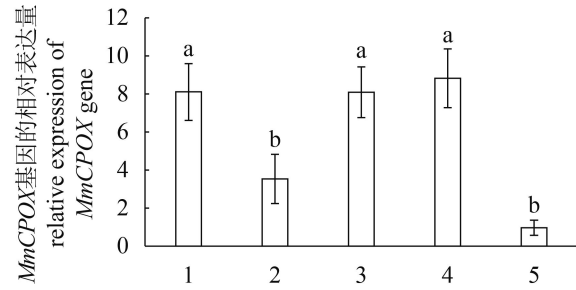


图8 不同壳色文蛤外套膜组织中 *MmCPOX* 基因的表达差异性分析($n=5$)

1. 红壳文蛤, 2. 黑斑文蛤, 3. 暗纹文蛤, 4. 细纹文蛤, 5. 白壳文蛤

Fig. 8 Analysis of expression difference from different colors of *MmCPOX* gene ($n=5$)

1. red shell, 2. black spot, 3. dark fringe, 4. thin checkered 5. white shell

浅程度呈正相关, 因此可以推断文蛤中 *MmCPOX* 基因的表达差异可能与卟啉类化合物的积累有关。

参考文献:

[1] 詹海莺, 刘海洋, 胡军, 等. 卟啉超分子的组装合成及其应用新进展[J]. 中国科学, 2009, 39(3): 253-268.
Zhan H Y, Liu H Y, Hu J, et al. Recent progress in self-assembly and applications of supramolecular porphyrins[J]. Science in China, 2009, 39(3): 253-268(in Chinese).

[2] 张跃环, 闫喜武, 张彭, 等. 贝类壳色多态的研究概况及展望[J]. 水产科学, 2008, 27(12): 680-683.
Zhang Y H, Yan X W, Zhang P, et al. Research advances and prospects on shell color polymorphism of mollusks[J]. Fisheries Science, 2008, 27(12): 680-683(in Chinese).

[3] 张秀丽, 刘庆慧, 陈文博, 等. 血蓝蛋白的研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(7): 86-89.
Zhang X L, Liu Q H, Chen W B, et al. Advance in hemocyanin[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2008, 29(7): 86-89(in Chinese).

[4] Zheng H P, Zhang G F, Liu X. Comparison of growth and survival of larvae among different shell color stocks of bay scallop *Argopecten irradians irradians* (Lamarck 1819)[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2005, 23(2): 183-188.

[5] 许飞, 郑怀平, 张海滨, 等. 海湾扇贝“中科红”品种与普通养殖群体不同温度下早期性状的比较[J]. 水产学报, 2008, 32(6): 876-883.
Xu F, Zheng H P, Zhang H B et al. Comparison on the

- larval traits between strain “Zhongkehong” and common cultured population of bay scallop *Argopecten irradians* under different temperature[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(6): 876-883(in Chinese).
- [6] 林志华, 董迎辉, 柴雪良, 等. 一种虎斑纹文蛤品系的选育方法[P]. 中国: 2009101001585. 2010-12-29.
Lin Z H, Dong Y H, Chai X L. Method for breeding tiger-stripe *Meretrix* Linnaeus strains [P]. China: 2009101001585. 2010-12-29(in Chinese).
- [7] 顾向飞, 林志华, 董迎辉, 等. 3种壳色花纹文蛤常规营养成分分析与评价[J]. 动物营养学报, 2014, 26(12): 3850-3857.
Gu X F, Lin Z H, Dong Y H, et al. Analysis and evaluation of general nutritive components of clams (*Meretrix meretrix*) with three kinds of shell colors and decorative patterns[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(12): 3850-3857(in Chinese).
- [8] Martasek P, Camadro J M, Delfau-Larue M H, et al. Molecular cloning, sequencing, and functional expression of a cDNA encoding human coproporphyrinogen oxidase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(8): 3024-3028.
- [9] Lee D S, Flachsová E, Bodnárová M, et al. Structural basis of hereditary coproporphyrin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(40): 14232-14237.
- [10] 姜薇, 姚琳, 江艳华, 等. 太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)类FUT2基因的克隆与组织表达[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 70-75.
Jiang W, Yao L, Jiang Y H, et al. Molecular cloning and expression of FUT2-like gene in the oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(5): 70-75(in Chinese).
- [11] 秦晓红. 人源原卟啉原氧化酶结构与功能的研究[D]. 天津: 南开大学, 2013.
Qin X H. Structural insight into human protoporphyrinogen oxidase[D]. Tianjing: Nankai University, 2013(in Chinese).
- [12] 黄河清. MALDI-TOF质谱技术分析加州海兔口腔神经节中超微量Leu-Leu多肽酶[J]. MALDI-TOF质谱技术分析加州海兔口腔神经节中超微量Leu-Leu多肽酶[J]. 分析仪器, 2004(2): 23-27.
Huang H Q. Analysis of ultramicro Leu-Leu endopeptidase in buccal ganglion of *Aplysia californica* by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Analytical Instrumentation, 2004(2): 23-27(in Chinese).
- [13] 曹劲松, 汤俊荣, 章跃陵, 等. 凡纳滨对虾血蓝蛋白与人红细胞的作用靶位[J]. 中国水产科学, 2012, 19(2): 211-216.
Cao J S, Tang J R, Zhang Y L, et al. Identification of interaction target of human erythrocyte recognized by *Litopenaeus vannamei* hemocyanin[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(2): 211-216(in Chinese).
- [14] 常青, 王晓良. 细胞色素C、线粒体与凋亡[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(3): 241-244.
Chang Q, Wang X L. Cytochrome C, mitochondria and apoptosis[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2003, 19(3): 241-244(in Chinese).
- [15] 彭文, 王江勇. 软体动物血蓝蛋白的结构和免疫功能的研究进展[J]. 水产科学, 2011, 30(3): 182-186.
Peng W, Wang J Y. Recent research progress on structure and immunologic function of molluscan hemocyanins[J]. Fisheries Science, 2011, 30(3): 182-186(in Chinese).
- [16] 朱长连, 王小阳, 邱林, 等. 新生大鼠脑缺氧缺血后细胞色素c释放与凋亡的关系. 新生大鼠脑缺氧缺血后细胞色素c释放与凋亡的关系[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(6): 437-440.
Zhu C L, Wang X Y, Qiu L, et al. Cytochrome C release and apoptosis in neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2004, 42(6): 437-440(in Chinese).
- [17] 张淑青. 人类卟啉症及贫血的斑马鱼疾病模型的建立与解析[D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
Zhang S Q. Creation and analysis of zebrafish mutants as models for human porphyrias and anemia [D]. Suzhou: Suzhou University, 2015 (in Chinese).
- [18] Comfort A. The pigmentation of molluscan shells[J]. Biological Reviews, 1951, 26(3): 285-301.
- [19] 张刚生, 谢先德, 王英. 我国主要育珠贝(蚌)贝壳珍珠层及珍珠的激光拉曼光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2001, 21(2): 193-196.
Zhang G S, Xie X D, Wang Y. Raman spectra of nacre from shells of main pearl-culturing mollusk in China[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2001, 21(2): 193-196(in Chinese).

- [20] 孙家美, 毛振伟. 贝壳珍珠层元素的X射线荧光光谱分析[J]. 湛江水产学院学报, 1991, 11(2): 25-30.
Sun J M, Mao Z W. The fluorescent X-ray spectrographic analysis of elements in the pearl layer of shells[J]. Journal of Zhanjiang Fisheries College, 1991, 11(2): 25-30(in Chinese).
- [21] Zheng H P, Liu H L, Zhang T, *et al.* Total carotenoid differences in scallop tissues of *Chlamys nobilis* (Bivalve: Pectinidae) with regard to gender and shell colour[J]. Food Chemistry, 2010, 122(4): 1164-1167.
- [22] 闻海波, 聂志娟, 曹哲明, 等. 不同颜色珍珠层的三角帆蚌组织中类胡萝卜素含量的分析[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(3): 265-268.
Wen H B, Nie Z J, Cao Z M, *et al.* Carotenoid levels in soft tissues of triangle pearl mussel *Hyriopsis cumingii* with different color nacreous layer[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(3): 265-268(in Chinese).
- [23] 李太武, 苏秀榕, 季延滨, 等. 不同发育阶段文蛤同工酶基因的表达研究[J]. 海洋学报, 2006, 28(5): 162-166.
Li T W, Su X R, Ji Y B, *et al.* Studies on the expressions of isozyme during ontogeny of *Meretrix meretrix*[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2006, 28(5): 162-166(in Chinese).
- [24] 王如才, 王昭萍. 海水贝类养殖学[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008.
Wang R C, Wang Z P. Science of marine shellfish culture[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2008(in Chinese).
- [25] 李太武, 张安国, 苏秀榕. 文蛤花纹的形态及形成观察[J]. 动物学杂志, 2008, 43(6): 83-87.
Li T W, Zhang A G, Su X R. Morphology and formation of stripes in *Meretrix meretrix*[J]. Chinese Journal of Zoology, 2008, 43(6): 83-87(in Chinese).
- [26] 朱东丽, 董迎辉, 林志华, 等. 利用微卫星标记对文蛤4个壳色花纹品系的遗传分析[J]. 水产学报, 2012, 36(2): 202-209.
Zhu D L, Dong Y H, Lin Z H, *et al.* Genetic analysis among four strains of different shell colors and decorative patterns of *Meretrix meretrix* using microsatellite markers[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(2): 202-209(in Chinese).
- [27] 管云雁, 何毛贤. 海产经济贝类壳色多态性的研究进展[J]. 海洋通报, 2009, 28(1): 108-114.
Guan Y Y, He M X. Progress on shell coloration polymorphism in seashells[J]. Marine Science Bulletin, 2009, 28(1): 108-114(in Chinese).
- [28] 朱东丽, 林志华, 董迎辉, 等. 文蛤(*Meretrix meretrix*)4个壳色花纹品系的遗传差异分析[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(3): 374-379.
Zhu D L, Lin Z H, Dong Y H, *et al.* Genetic variation analysis of four strains of *Meretrix meretrix* that have different shell colors and decorative patterns[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2011, 42(3): 374-379(in Chinese).
- [29] 郑怀平, 许飞, 张国范, 等. 海湾扇贝壳色与数量性状之间的关系[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(4): 328-333.
Zheng H P, Xu F, Zhang G F, *et al.* Relationships between shell colors and quantitative traits in the bay scallop, *Argopecten irradians irradians* (Lamarck, 1819)[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2008, 39(4): 328-333(in Chinese).

Gene cloning of *CPOX* and correlation analysis of shell colors in *Meretrix meretrix*

ZHAN Yanling¹, DONG Yinghui¹, HE Lin^{1*}, RUAN Wenbin², GAO Xiaoyan¹, LIN Zhihua¹

(1. Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resource of Zhejiang, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Coproporphyrinogen-III oxidase (*CPOX*) is a key enzyme in the synthesis of porphyrins, which plays an important role in the formation of pigment. cDNA of *Meretrix meretrix CPOX* (*MmCPOX*) was cloned by SMART RACE techniques, then the bioinformatics and expression profiles in different tissues and developmental stages were analyzed. The results indicated that the full length cDNA of *MmCPOX* gene was 1490 bp, containing a 1173 bp opening reading frame (ORF) encoding 390 amino acids. The molecular weight of *MmCPOX* was 12.04 ku and pI was 5.05. It was also predicted that protein *MmCPOX* had a transmembrane region and a Coprogen-oxidase region. Comparisons of amino acid sequence, *MmCPOX* was highly homologous with *Aplysia californica* and shares 64.5% similarity. The result of qRT-PCR showed that *MmCPOX* gene was expressed in all stages, and significantly increased from D-shaped larva stage ($P < 0.01$). *MmCPOX* was expressed in all seven tissues, in which the expressions in mantle and blood were significantly higher than those of other tissues ($P < 0.01$), indicating that it was related to synthesis of hematoporphyrin and formation of shell porphyrin. Considering different shell colors, the relative expressions of mantle in red color, dark fringe and thin checkered shells, were significantly different from the black and white shells ($P < 0.05$), suggesting that *MmCPOX* gene was responsible for the formation of red and brown shell color.

Key words: *Meretrix meretrix*; *CPOX*; shell color; cloning and expression

Corresponding author: HE Lin. E-mail: hlwithyou@qq.com

Funding projects: Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-48); Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Y16C190015); Science and Technology Project of Jiangsu Province (BN2015059); Ningbo Project of Agricultural Science and Technology (2016C70002)