

三角帆蚌 *HcCUBDC* 基因 cDNA 的全长克隆与表达分析

罗红瑞¹, 白志毅^{1,2}, 刘晓军^{1,2}, 李清清¹, 董绍建¹, 曾仕梅¹, 李家乐^{1,2,3*}

(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. 上海海洋大学上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306;
3. 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: 为寻找珍珠层颜色形成相关基因, 以转录组文库中标注的序列为模板, 利用 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 方法, 获得了三角帆蚌 *HcCUBDC* 基因的全长 cDNA 序列, 共 5 158 bp, 开放阅读框 (ORF) 1 920 bp, 编码 639 个氨基酸, 5' 端非编码区 576 bp, 3' 端非编码区 2 662 bp, GenBank 登录号为 KP067952。生物信息学分析表明, 三角帆蚌 *HcCUBDC* 蛋白含有一个由 19 个氨基酸组成的信号肽和 4 个 CUB 结构域, 但未能比对上已知的蛋白。经荧光定量 PCR 检测, *HcCUBDC* 基因在紫色和白色蚌前端缘膜、后端缘膜、中央膜、鳃、斧足、肝胰腺、肠和肾 8 个组织中均有表达, 并且都是肝胰腺中表达量最低。在紫色蚌中, 后端缘膜表达量极显著高于前端缘膜; 在白色蚌中, 前端和后端缘膜之间表达差异不显著。*HcCUBDC* 基因在紫色蚌后端缘膜中的表达量极显著高于白色蚌, 在紫色和白色蚌前端缘膜中的表达量差异不显著。外套膜原位杂交结果显示, *HcCUBDC* 基因主要在缘膜外上皮细胞中表达。研究表明, *HcCUBDC* 基因在三角帆蚌贝壳珍珠层颜色形成中发挥作用, 可为进一步深入研究该基因在珍珠颜色形成过程中的功能及其调控机理提供基础资料。

关键词: 三角帆蚌; 珍珠层颜色; *HcCUBDC* 基因; 序列克隆; 表达

中图分类号: Q 785; S 966.2

文献标志码: A

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 是中国特有的优良淡水育珠蚌^[1], 所产珍珠颜色包括白色、粉色、黄色和紫色等。颜色是评价珍珠质量的重要指标^[2]。目前, 珍珠的呈色机理尚无定论, 主要有金属离子致色学说^[3-4]、有机物致色学说^[5-9]和结构致色学说^[10-14], 研究较多的是有机物中的卟啉^[5]、类胡萝卜素^[6-7]、多烯类物质 (polyenes)^[8] 和鸚鵡二烯烃 (parrodienes)^[9]。研究表明, 贝壳珍珠层颜色或内壳色是可以遗传的^[15-16], 海水珍珠颜色主要由供片贝壳珍珠层颜色决定^[17-19], 淡水珍珠中, 供片贝壳珍珠层颜色显著影响珍珠颜色^[20-21]。然而, 珍珠和贝壳珍珠层颜色形成相关基因方面的研究仅见 Bai 等^[22] 和 Li 等^[23] 的报道。Bai 等^[22] 构建了紫色和白色家系三角帆蚌外

套膜转录组文库, 筛选得到一批在紫色和白色家系三角帆蚌之间表达差异显著的基因。Li 等^[23] 在此基础上, 通过候选基因法筛选出 1 个与类胡萝卜素吸收代谢相关的载脂蛋白 (apolipoprotein, APO) 基因, 研究结果表明该基因在紫色家系三角帆蚌鳃、肝胰腺、肾、外套膜边缘膜和中央膜中的表达量显著高于白色家系, 并且主要参与了贝壳棱柱层和角质层的形成。另外, Miyashita 等^[24] 通过蛋白质组学研究发现酪氨酸酶是导致合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 所产珍珠出现蓝色的原因, 但未能定位到具体的基因。因此, 研究贝壳内壳色形成机制, 寻找颜色相关基因, 实现贝壳内壳色和珍珠颜色调控, 对于促进珍珠颜色选育研究和我国珍珠产业的良性发展具有重要意义。

收稿日期: 2015-01-21 修回日期: 2015-05-13

资助项目: 国家自然科学基金 (31272657); 国家科技支撑计划 (2012BAD26B04); 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心 (ZF1206)

通信作者: 李家乐, E-mail: jlli2009@126.com

CUB(Clr/Cls, Uegf, Bmp1) 结构域最早是在补体亚成分 Clr/Cls, 海胆表皮生长因子样蛋白(Uegf)和骨形态形成蛋白 1(Bmp1)这 3 种蛋白中发现并命名的,一般含有大约 110 个氨基酸残基,绝大多数具有 4 个保守的半胱氨酸残基以构成 2 个二硫键(Cys-1-Cys-2, Cys-3-Cys-4),广泛存在于细胞外和细胞质膜相关蛋白中,其中绝大部分是发育相关蛋白,如含有 27 个 CUB 结构域的 cubilin 蛋白^[25]、4 个 CUB 结构域的 SOL-1^[26]等, CUB 结构域可能与寡聚化、基质识别和结合伴侣有关^[27-29]。目前,在海淡水贝中尚未见含有 CUB 结构域的蛋白的报道。本实验以 Bai 等^[22]构建的转录组文库为基础,从三角帆蚌中克隆得到一个仅含有 4 个 CUB 结构域的蛋白基因,命名为 *HcCUBDC* (CUB domain containing protein from *Hyriopsis cumingii*),并对其在紫色和白色内壳色三角帆蚌各组织中的表达差异进行了分析,旨在为阐明 *HcCUBDC* 基因在三角帆蚌贝壳内壳色形成中的调控作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用紫色和白色内壳色三角帆蚌(图 1)均为 2 龄蚌,采自浙江省金华市浙星珍珠商贸有限公司,为本实验室通过家系选育^[16]得到。紫色内壳色三角帆蚌(下文简称紫色蚌)指贝壳边缘制片区或缘膜部对应的珍珠层颜色前、中、后部由白到紫过渡的蚌,呈现出制片区珍珠层前端白色,后端紫色。白色内壳色三角帆蚌(下文简称白色蚌)指贝壳边缘制片区或缘膜部对应的珍珠层颜色前、中、后部均为白色的蚌。样品采回后于实验室暂养 1 周,暂养结束后从白色和紫色家系三角帆蚌中各随机挑取 18 只,取其外套膜前端缘膜(与前端闭壳肌相连并靠近后端的缘膜)、外套膜后端缘膜(与后端闭壳肌相连并靠近前端的缘膜)、外套膜中央膜、鳃、斧足、肝胰腺、肠和肾脏等组织,等量相同组织混合在一起经液氮研磨后分装保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。

Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司, PrimeScript™ RT-PCR Kit, 3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase, 5'-Full RACE Kit with TAP, TaKaRa LA Taq®, Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0)、PrimeScript™ RT reagent Kit with

gDNA Eraser(Perfect Real Time)、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)购自宝生物工程(大连)有限公司, pEASY®-T1 Simple Cloning Kit、pEASY®-T3 Cloning Kit、T7 High Efficiency Transcription Kit、EasyPure® Quick Gel Extraction Kit 购自北京全式金生物技术有限公司, *E. coli* DH5α 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司。DIG RNA Labeling Mix、DIG Wash and Blocking Buffer Set 和 DIG Nucleic Acid Detection Kit 购自 Roche。



图 1 紫色(左)和白色(右)内壳色三角帆蚌
Fig. 1 *H. cumingii* of purple(the left) and white (the right) inner-shell colors

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 第一条链的合成

按照 Trizol 试剂说明书提取三角帆蚌各组织总 RNA,采用分光光度计 NanoDrop 2000 c (Thermo Scientific, 美国)和 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 的浓度、纯度和完整性,按照 PrimeScript™ RT-PCR Kit 说明书反转录合成 cDNA, -20 °C 保存。

1.3 *HcCUBDC* 基因小片段的扩增、克隆和序列测定

根据本实验室构建的紫色和白色家系三角帆蚌外套膜转录组文库中已标注的 contig 序列^[22],利用 Primer Premier 5.0 设计特异性上游引物 P-F1 和下游引物 P-R1 用于小片段的扩增来验证 contig 序列,所用引物(表 1)均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系:Premix Taq (Ex Taq) 12.5 μL,上下游引物 P-F1 和 P-R1 (10 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 9.5 μL,模板 cDNA 1 μL。PCR 反应程序:94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 10 °C 保温。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用 EasyPure® Quick Gel Extraction Kit 割胶回收目的条带,并连接于 pEASY-T1 Simple 载体,转化到感受态细胞 *E. coli* DH5α,经 LB 平板

(含 Amp、IPTG 和 X-Gal) 培养进行蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆(白色菌落)到含有 Amp 的液体 LB 培养基中, 37 °C, 200 r/min 培养 12 h 左右, 经菌液 PCR 检测进一步确认为目的阳性克隆后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测到一条大小为 100 ~ 250 bp 的条带, 测序得到一条 195 bp 的核苷酸序列, 经比对发现与 contig 序列中的相应序列完全重合, 因此可认为 contig 序列拼接正确, 可直接用来作为模板设计 RACE 引物。

1.4 *HcCUBDC* 基因 RACE 片段的扩增、克隆和序列测定

根据已有 contig 序列, 用 Primer Premier 5.0 设计 5'-RACE 基因特异性外侧引物 GSP-R1 和内侧引物 GSP-R2, 3'-RACE 基因特异性外侧引物 GSP-F1 和内侧引物 GSP-F2, 所用引物(表 1)均

由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

RACE 反转录以三角帆蚌外套膜总 RNA 为模板。5'-RACE 和 3'-RACE 反转录分别使用 5'-Full RACE Kit with TAP 试剂盒和 3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase 试剂盒, 后续 PCR 扩增使用 RACE 试剂盒推荐的 TaKaRa LA Taq 试剂盒。根据 RACE 试剂盒采用的套式 PCR 原理, Outer PCR(第一轮 PCR)反应使用试剂盒自带 RACE Outer Primer 和基因特异性外侧引物 GSP-R1(5'-RACE)或者 GSP-F1(3'-RACE), Inner PCR(第二轮 PCR)反应使用试剂盒自带 RACE Inner Primer 和基因特异性内侧引物 GSP-R2(5'-RACE)或者 GSP-F2(3'-RACE), 退火温度 55 °C, 延伸时间 1 min, 具体反应体系和程序参照说明书。PCR 产物的纯化、克隆和序列测定同上述小片段的克隆。

表 1 实验中所用引物
Tab. 1 Primers used in the experiments

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence	用途 usage
P-F1	GGATCCAGATATGCCTCATGGC	小片段扩增
P-R1	TGGAACCCAAACACATTGCG	fragment amplification
GSP-F1	GGATCCAGATATGCCTCATGGC	3'-RACE
GSP-F2	CTACAACAGTACAAGCTCCAAAGTG	3'-RACE
3'-RACE outer primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT	3'-RACE
3'-RACE inner primer	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG	3'-RACE
GSP-R1	TGGAACCCAAACACATTGCG	5'-RACE
GSP-R2	CTGCTGGACATCAACTGATTGG	5'-RACE
5'-RACE outer primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	5'-RACE
5'-RACE inner primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	5'-RACE
P-F2	TGCTACTTCTGTCCCATTCGCA	qRT-PCR
P-R2	GCAAACATTTGGACACATGCAA	qRT-PCR
EF1 α -F	GGAACCTCCAGGCAGACTGTGC	qRT-PCR
EF1 α -R	TCAAAACGGGCCGAGAGAAT	qRT-PCR
P-F3	TGAACGTGAGACATCAGGGGG	
P-R3	CTTTTTCCAAGCACAGCCAT	原位杂交 <i>in situ</i> hybridization
P-T7	GATCACTAATACGACTCACTATAGGG	

1.5 序列拼接与生物信息学分析

去除测序结果中的载体序列后利用

Sequencher 软件进行拼接得到 *HcCUBDC* 基因全长 cDNA 序列。通过 ORF Finder 程序(<http://>

www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) 确定开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF); 用 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对核苷酸序列和氨基酸序列进行相似性分析; 用 SMART 程序 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 PROSITE 程序 (<http://prosite.expasy.org/prosite.html>) 预测蛋白质的结构域; 用 ProtParam 程序 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测氨基酸序列的物理参数; 用 SignalP 4.1 Server 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽; 用 TMHMM Server v. 2.0 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测跨膜结构; 用 Phyre² 程序 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 预测蛋白质的二级结构和三级结构^[30]; 使用 ClustalW2 在线程序 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 进行多重序列比对。

1.6 *HcCUBDC* 基因的组织表达分析

以获得的基因 cDNA 全长序列为模板, 利用 GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design 程序 (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>) 设计荧光定量 PCR 上游引物 P-F2 和下游引物 P-R2。根据 Bai 等^[31] 的研究, 选择 EF1 α 作为内参基因, 上下游引物分别为 EF1 α -P-F 和 EF1 α -P-R (表 1)。以紫色蚌和白色蚌前端缘膜、后端缘膜、中央膜、鳃、斧足、肝胰腺、肠和肾脏 8 个组织总 RNA 为模板, 按照 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒说明书去除总 RNA 中的基因组 DNA, 并反转录成 cDNA, -20 °C 保存。实时荧光定量 PCR 反应采用 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒在 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, SYBR[®] Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 \times) 10 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.8 μ L, ddH₂O 6.8 μ L 及 cDNA 模板 1.6 μ L。其中每个样品的目的基因和内参基因分别进行 4 次技术重复。反应程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 35 s, 40 个循环; 95 °C 10 s, 65 ~ 95 °C 获得熔点曲线。将 cDNA 模板以 5 为单位进行 6 个梯度的稀释, 用于制作目的基因和内参基因的标准曲线。相对

表达量数据分析采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法^[32], 数据表示方式为平均值 \pm 标准差, 并采用 SPSS 18.0 软件中的单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 为差异显著 (以 * 表示), $P < 0.01$ 为差异极显著 (以 ** 表示)。使用 GraphPad Prism 5 软件绘制柱状图。

1.7 RNA 探针的制备

根据 *HcCUBDC* 基因序列设计原位杂交特异性引物 P-F3 和 P-R3 (表 1), 扩增片段长度为 727 bp。扩增产物经割胶回收纯化后连接到 *pEASY-T3* 载体, 挑取白色阳性克隆扩大培养, 以 P-T7 (表 1) 为上游引物, P-F3 和 P-R3 分别为下游引物进行菌液 PCR 验证并测序。测序验证插入方向正确后, 提取质粒, 并以该质粒为模板, 以 P-T7 为上游引物, P-F3 和 P-R3 分别为下游引物进行 PCR 扩增, 并割胶回收纯化作为后续体外转录的模板。体外转录采用 T7 High Efficiency Transcription Kit 和 DIG RNA Labeling Mix, 分别以 P-T7 和 P-F3, P-T7 和 P-R3 扩增产物作为用于制备反义和同义探针的模板, 具体步骤参照说明书。探针纯化步骤: 每 22 μ L 反应体系加 100 μ L 3.8 M 醋酸铵和 600 μ L -20 °C 预冷无水乙醇, 混匀后 -80 °C 静置 30 min, 12 000 $\times g$ 4 °C 离心 20 min 后弃上清液, 加 200 μ L -20 °C 预冷 70% 无水乙醇洗涤沉淀, 12 000 $\times g$ 4 °C 离心 10 min 后, 弃上清液, 室温干燥沉淀 5 min 后加入 40 μ L DEPC 水溶解。经分光光度计 NanoDrop 2000 c 和 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 探针浓度和纯度后, -80 °C 保存备用。

1.8 原位杂交

取三角帆蚌外套膜于含 0.1% DEPC 的 4% 多聚甲醛中, 4 °C 固定 4 h 后转入去 RNase 的 20% 蔗糖溶液中固定 24 h, 然后在 Leica CM1950 冰冻切片机上进行冰冻切片, 切片厚度为 10 μ m。冰冻切片经 40 °C 烤片过夜后进行后续杂交实验。具体步骤: 20% 乙酸处理 10 min 以灭活内源性碱性磷酸酶, DEPC 水洗 5 min \times 2, 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶 37 °C 消化 90 s, 0.2% 甘氨酸处理 10 min, 1 \times PBS 处理 5 min \times 2, 4% 多聚甲醛处理 5 min, 1 \times PBS 处理 5 min, 50 °C 预杂交 2 h (预杂交液主要成分为去离子甲酰胺、硫酸葡聚糖、Denhardt's 和酵母 tRNA), 50 °C 杂交 (杂交液为探针和预杂交液的混合液) 20 h, 杂交后经 1:1 去

离子甲酰胺:1 × SSC 50 °C 处理 30 min, 2 × SSC 37 °C 处理 10 min, 2 × SSC 稀释到 20 μg/mL 的 RNase A 37 °C 处理 30 min, 2 × SSC 37 °C 处理 10 min, 0.5 × SSC 37 °C 处理 10 min × 2, 0.2 × SSC 37 °C 处理 10 min × 3, Washing buffer 室温处理 5 min, Blocking solution 处理 2 h, 1% BSA 处理 30 min, Blocking solution 稀释的 Anti-digoxigenin-AP conjugate 孵育 1 h, Washing buffer 处理 20 min × 2, Detection buffer 处理 10 min, Detection buffer 稀释的 NBT/BCIP 显色液避光显色 16 h 后显微镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 *HcCUBDC* 基因 cDNA 全长的克隆和序列分析

5'-RACE 和 3'-RACE 分别扩增得到 1 000 ~ 2 000 bp 和大于 2 000 bp 的单一、明亮条带,经克隆测序分析,分别为 1 835 和 3 179 bp。拼接得到的 *HcCUBDC* 基因 cDNA 序列全长 5 158 bp,其中 ORF 为 1 920 bp,编码 639 个氨基酸(图 2),5'-UTR 为 576 bp,3'-UTR 为 2 662 bp。GenBank 登录号为 KP067952。

ProtParam 在线软件预测该蛋白分子量为

```

1   MVICLEGIVLFMAYLMVYSDGVNPACECVTFQSYGQSQGRFRHSPNFPQPSNHSIDCILYT
61  FVGDVNELVQITFLEFDLKPSPSPGQCSDFLKMFLNIDRPEVNEHSHKWEVLCGNIS
121 NLKQKTYYSRSLILEYHTTSKSTGHFTGFRGTFKFFNQADFRNDGHKQLGKQCSYFFQ
181 SSNNGTKGKFFSPRYPQNYPKGSNCQYIFMGHAKERIVIRFQNIQLDNRDSSCQSNPDTV
241 KVYDSNNKDGKILREICGIHNQLDIVSSGQYMFIEFNSDHHHESQGFAATFEFTDDANPY
301 TQQPPPQNGETRSTSDNFTSCNMKSSVNAKNGTIESHSYPHPYPPSIKCNYEFEGEGQ
361 ERVQLSFKMNLYNNGDPMPHGCINQDSISVFIYIENKEILLGQYCGNKSPNQLMSSS
421 QRMKVVFVTSSHSETRNVFGFQLEYNFRTDFGVQSGSIQDQRKGLFHYNSTSSKVGFFT
481 SPNFPQYPPYTECNYQFHGLGKNKEERVIFTFDDFYVGESGCEKFTESDYVSFSNFLSS
541 EDRKLPRLCGQMNPGQVIRESDGAFFRVTFKSNDIYDATGFKANYRFVPVYEIVTPTLPN
601 HERETSGGTSISPGTSHDHVTVMGTVYLLFLTVIFHVL

```

图 2 推测的三角帆蚌 *HcCUBDC* 基因氨基酸序列

下划线表示信号肽,阴影表示 4 个 CUB 结构域

Fig. 2 Deduced amino acid sequence of *HcCUBDC* in *H. cumingii*

The predicted signal peptide sequence is underlined and the positions of the four CUB domains are enclosed in shaded boxes

2.2 *HcCUBDC* 基因在紫色蚌和白色蚌各组织中的差异表达分析

半定量结果显示该基因在各组织中均有表达,且都在肝胰腺中表达量最低(图 5)。荧光定量 PCR 结果显示,*HcCUBDC* 基因在 8 种组织中

72.68 ku,理论等电点为 6.10,丝氨酸(Ser)含量最高,为 10.3%,色氨酸(Trp)含量最低,为 0.2%。SignalP 4.1 Server 在线程序预测该蛋白 N 端含有一段由 19 个氨基酸残基构成的信号肽(MVICLEGIVLFMAYLMVYS)。BLASTp、SMART 和 PROSITE 分析结果表明,三角帆蚌 *HcCUBDC* 蛋白属于 CUB 超家族,只含有 4 个 CUB 结构域(26 ~ 158, 175 ~ 294, 322 ~ 448 和 465 ~ 588)(图 2),每个结构域含有 3 个保守的半胱氨酸残基,但未能比对到已知的蛋白,因此命名为 *HcCUBDC* (CUB domain containing protein from *H. cumingii*)。与从巨型管虫(*Riftia pachytila*)中鉴定得到的新的 CUB 结构域包含蛋白 RP43 多重序列比对结果显示,三角帆蚌 *HcCUBDC* 蛋白 4 个 CUB 结构域含有 6 个保守的氨基酸位点(图 3)。TMHMM 分析结果显示该蛋白无跨膜结构。Phyre² 分析结果表明 *HcCUBDC* 肽链的二级结构主要以 β 折叠为主,占可推测序列的 48%,不含 α 螺旋,高级结构预测结果显示该蛋白属于转运蛋白,与已知的人 cubilin 蛋白 D 链结构最为相似,该结构的主要功能是与内因子维生素 B₁₂ 复合物结合^[33](图 4)。

均有表达,且都在肝胰腺中表达量最低,与半定量结果相符。*HcCUBDC* 基因的相对表达量除在紫色和白色蚌后端缘膜中差异极显著外,在其他 7 种组织中差异均不显著,且表达规律一样,表达量从高到低依次为中央膜、斧足、前端缘膜、肠、鳃、

肾和肝胰腺。在白色蚌中, *HcCUBDC* 基因在前端缘膜和后端缘膜中表达差异不显著; 在紫色蚌

中, *HcCUBDC* 基因在前端缘膜中的相对表达量极显著低于后端缘膜。

RP43/Rifpa-2	CN ---SLHTIF--GSHGEFGTVGP-AYGNFE ECS-WKIEVPNG---KRVRLHFKRPHLEN	50
RP43/Rifpa-3	CS ---VVNLT--GPSGTFGTGS-QYENNEVCS-WKIEVAQN---KRVLLHIYRFNIEV	50
RP43/Rifpa-1	CSKPSSLKAVSRAGHAGYFGTIGSGKYKNNENCW -WSIQAPAD---QRLRLHFESLYLEY	56
HcCUBDC-2	CS --YFFQSSNNGTKGKFFSPRYPQNYPKGSNCQ-YIFMGHAK---ERVIVRFQNIQLDN	54
HcCUBDC-3	CN ---MKSSVNAKNGTIESHSYPHPYPPSIKCN-YEFEGEGQ---ERVQLSFKKMNLYY	53
HcCUBDC-4	CL --FHYNSTSSKVGFFTSPNFPQYPPYTECN-YQFHGLGKNKEERVFITFDDFYVGE	56
HcCUBDC-1	CEC --VTFQSYGQSQRGFHSPNFPQPSNHSIDCILYTFVGDVN---ELVQITFLEFDLKP	55
	* . . . * : : : : : :	
RP43/Rifpa-2	NNKY-----CPYDK--LKIYDG-SSASASLKGTLGKRRPKDIES---TGKTMFVTFSS	98
RP43/Rifpa-3	EAN-----CEYDS--LTVYKG-PNSAPMLGKYCGETIPTFMVS---SGNTMFIKFQT	97
RP43/Rifpa-1	GNNRY-----CPYDY--VNIHNG-KNENGQRLGKYCGIKAPDDIIT---TGNSAYVRFST	104
HcCUBDC-2	RDSS-----CQSNPDTVKVYDS-NNKDGKILREICGHNQLDIVS---SGQYMFIEFNS	104
HcCUBDC-3	NGGDPMPHGCINQD-SISVFIY-IENKEILLGQYCGNKSPNQLMS---SSQRMKVVFVS	108
HcCUBDC-4	SGCEK-----FTESDYVSFSNF-LSEDRKLPRLCGQMNPQVIRESDGAFFRVTFKS	108
HcCUBDC-1	PSFSPSGPQCSDFLKMFLNDRPEVNEHSKWDEVLCGNISNLKQKTYYSRSLILEYHT	115
	.. . ** . : : :	
RP43/Rifpa-2	DISLTFP---GFRIQYSVP	114
RP43/Rifpa-3	DGSARKP---GFWIGYTTG	113
RP43/Rifpa-1	DSSVTKY---GFRLRYSIV	120
HcCUBDC-2	DHHHESQ---GFAATFEFT	120
HcCUBDC-3	TSHSETRNVFGFQLEYNFR	127
HcCUBDC-4	NDIYDAT---GFKANYRFV	124
HcCUBDC-1	TSKSTGHFT-GFRGTFKFF	133
	** :	

图3 三角帆蚌 *HcCUBDC* 蛋白 CUB 结构域与巨型管虫 RP43 蛋白 CUB 结构域的多重比对

“*”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

Fig. 3 Multiple alignment of CUB domains between *HcCUBDC* of *H. cumingii* and RP43 of *R. pachytila*

“*” indicates highly conserved amino acid residue; “:” indicates conservative amino acid residue which was replaced; “.” represents similar amino acid

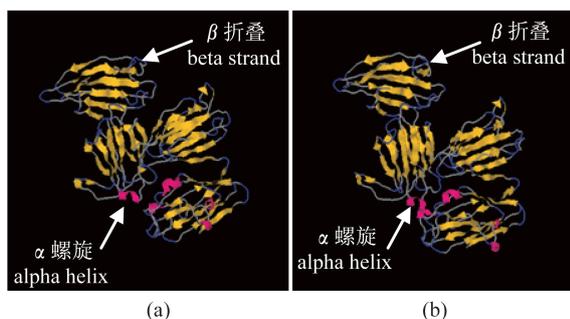


图4 Phyre^2 预测的 *HcCUBDC* 蛋白 (a) 和模板 (b)

Fig. 4 *HcCUBDC* (a) and template (b) protein tertiary structure by Phyre^2

2.3 原位杂交结果

原位杂交结果显示, 杂交信号主要出现在外套膜缘膜部的外上皮细胞中, 边缘膜外褶的内

上皮细胞中也有一些微弱的信号(图6)。阴性对照中无杂交信号。

3 讨论

本实验从三角帆蚌中克隆得到一个 CUB 结构域包含蛋白基因, 命名为 *HcCUBDC*。三角帆蚌 *HcCUBDC* 蛋白只含有 4 个 CUB 结构域, 无其他结构域, 未能比对上已知的 CUB 结构域包含蛋白, 是一个新的 CUB 结构域包含蛋白。该蛋白具有一个信号肽, 无跨膜结构域, 二级结构主要为 β 折叠, 具有 6 个保守的氨基酸位点, 与大多数 CUB 结构域包含蛋白相似^[28-29,34]。人 (*Homo sapiens*) cubilin 蛋白含有 27 个 CUB 结构域, 是一种多配体受体, CUB 结构域是其发挥多配体受体

功能的结构基础,并且 CUB 结构域的多样性决定了可结合配体的多样性^[35],因此推测三角帆蚌

HcCUBDC 蛋白是一种分泌性细胞外蛋白,具有与 cubilin 蛋白相似的多配体受体功能。

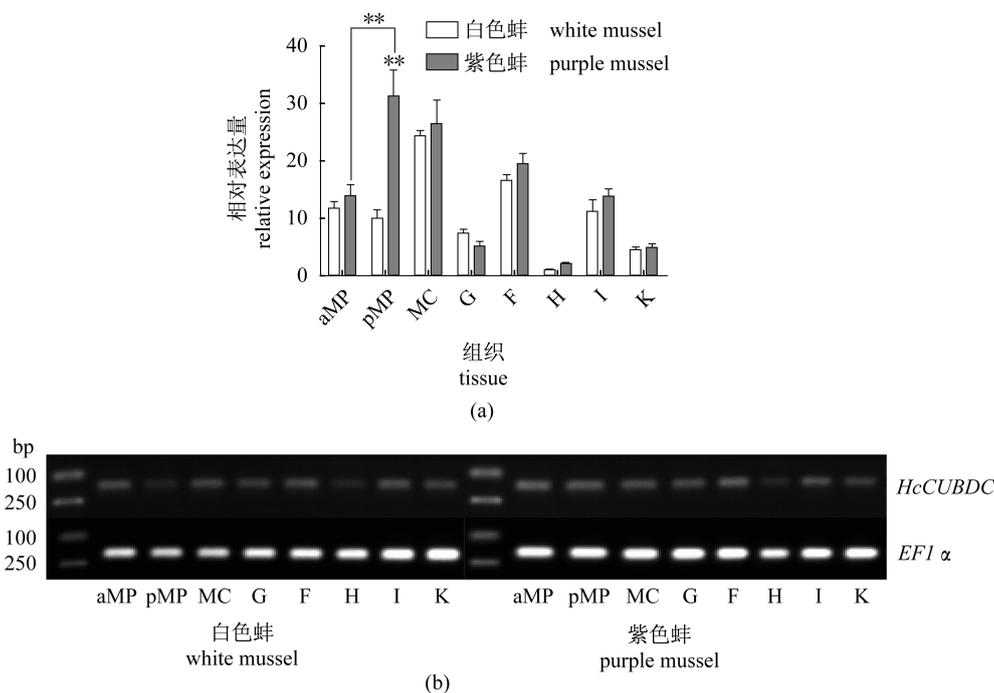


图5 *HcCUBDC* 基因在紫色蚌和白色蚌各组织中的表达

(a) 荧光定量 PCR 结果; (b) 半定量 PCR 结果; aMP. 前端缘膜; pMP. 后端缘膜; MC. 中央膜; G. 鳃; F. 斧足; H. 肝胰腺; I. 肠; K. 肾

Fig. 5 Expression of *HcCUBDC* gene in various tissues of purple and white mussels

(a) results of real-time Q-PCR; (b) results of semiquantitative PCR; aMP. anterior mantle pallial; pMP. posterior mantle pallial; MC. mantle center; G. gill; F. foot; H. hepatopancreas; I. intestine; K. kidney

本实验中紫色蚌和白色蚌的区别在于外套膜缘膜部(制作小片的部位)所对应的贝壳珍珠层颜色的不同。紫色蚌缘膜部所对应的贝壳珍珠层的颜色从后端到前端由紫色逐渐向白色过渡,呈现出后端紫色,前端白色;而在白色蚌中,前后端均为白色。荧光定量结果显示,*HcCUBDC* 基因仅在紫色和白色蚌后端缘膜中表达差异显著,表现为紫色蚌后端缘膜表达量极显著高于白色蚌;同时,*HcCUBDC* 基因在紫色蚌后端缘膜中的表达量极显著高于前端缘膜,在白色蚌前端和后端缘膜中的表达量差异不显著。该结果与紫色和白色三角帆蚌表型差异相吻合,证明 *HcCUBDC* 基因可能与三角帆蚌贝壳珍珠层紫色的形成具有较大的相关性。

与海水贝中的合浦珠母贝相似^[36],三角帆蚌外套膜也可分为边缘膜、缘膜和中央膜,是主要的参与生物矿化的组织,并且具有从周围环境中吸

收和分泌物质的能力。由于三角帆蚌贝壳棱柱层宽度明显较海水贝窄,在取样时很难像海水贝那样与边缘膜分开,因此本实验所取缘膜对应的壳层仅为珍珠层。*HcCUBDC* 基因主要在外套膜(尤其是中央膜和紫色蚌后端缘膜)、斧足和肠中表达,在鳃和肾中表达量较低,在肝胰腺中几乎不表达,推测 *HcCUBDC* 基因可能与贝壳珍珠层的形成有关,导致三角帆蚌贝壳珍珠层呈色的物质可能主要是通过肠和斧足吸收进入体内,再由外套膜将致色物质分泌到珍珠层中,导致贝壳珍珠层颜色的形成。

三角帆蚌外套膜缘膜主要与珍珠层的形成有关,边缘膜主要与棱柱层和角质层的形成有关^[36-37],原位杂交信号主要出现在缘膜外上皮细胞中,在边缘膜及其外褶内外表皮细胞中仅检测到微弱的信号,推测 *HcCUBDC* 基因可能主要参与了三角帆蚌贝壳珍珠层的形成。

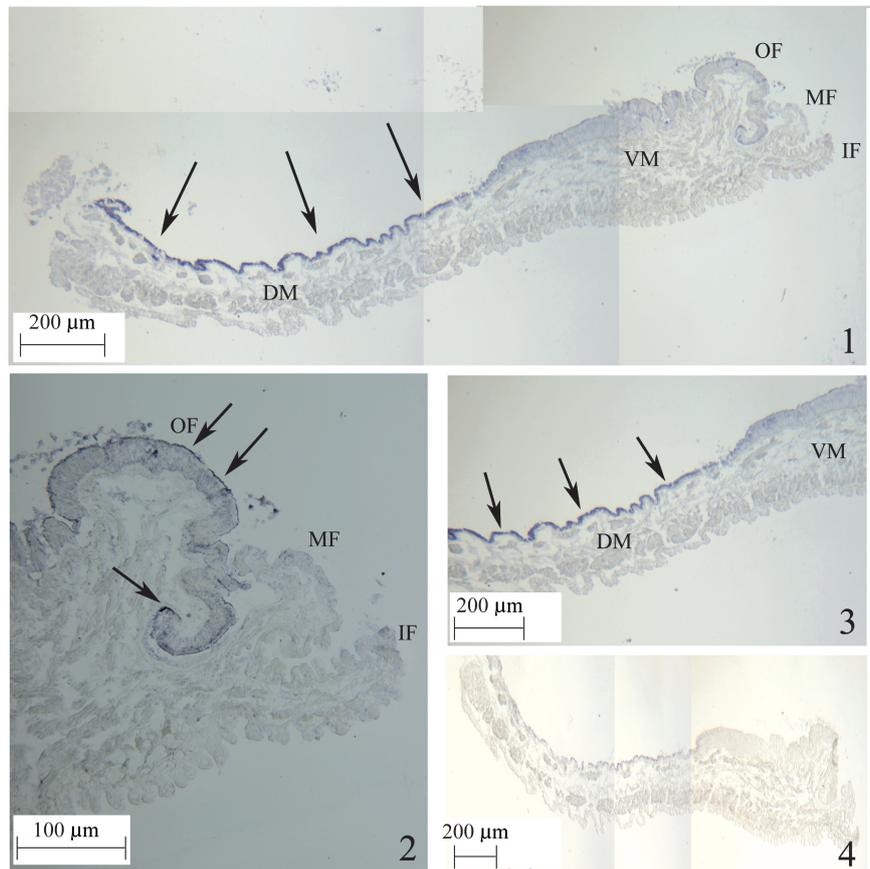


图6 三角帆蚌 *HcCUBDC* 基因的外套膜组织学原位杂交

1. 反义探针; 2和3为1的局部放大图; 4为同义探针

阳性信号为箭头所指蓝紫色; DM. 背侧; VM. 腹侧; IF. 内褶; MF. 中褶; OF. 外褶

Fig. 6 *In situ* hybridization of *HcCUBDC* gene in *H. cumingii* mantle

1. antisense probes; 2 and 3 are higher magnifications of 1; 4. sense probes

Positive signal is indicated in dark blue and arrow heads; DM. dorsal mantle; VM. ventral mantle; IF. inner fold; MF. middle fold; OF. outer fold

珍珠颜色和贝壳内壳色主要体现在珍珠层的颜色,因此珍珠或贝壳内壳色的形成与生物矿化,尤其是珍珠层的形成密切相关。珍珠层的无机相为碳酸钙晶体,约占总质量的95%,主要由基质蛋白(matrix proteins)组成的有机相约占5%,基质蛋白主要由蛋白和糖蛋白组成,在碳酸钙生物矿化中起着重要的调控作用^[38]。CUB结构域可能与寡聚化、基质识别和结合伴侣有关,可能参与了蛋白质之间及蛋白质和糖蛋白之间的相互作用^[27-29]。Chamoy等^[34]从巨型管虫中新分离得到一个只含有3个CUB结构域的蛋白,命名为RP43,并推测该蛋白可能具有将几丁质和基质蛋白组装起来参与外骨骼形成的桥梁作用。因此,推测三角帆蚌 *HcCUBDC* 蛋白可能是将致色物质

和其他基质蛋白结合起来参与珍珠层的形成并最终导致贝壳内壳色的形成,具体的机制有待更深入的研究。

参考文献:

- [1] Li J L, Li Y S. Aquaculture in China-freshwater pearl culture [J]. *World Aquaculture*, 2009, 40 (1): 60-62.
- [2] Li J L, Liu Y. The main influencing factors on the quality of cultured pearls [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35 (11): 1753-1760. [李家乐, 刘越. 影响养殖珍珠质量的主要因子. *水产学报*, 2011, 35 (11): 1753-1760.]
- [3] Yang M Y, Guo S G, Shi L Y, et al. Study on compositions and colouring mechanism of freshwater

- cultured pearls [J]. *Journal of Gems & Gemology*, 2004, 6(2): 10 - 13. [杨明月, 郭守国, 史凌云, 等. 淡水养殖珍珠的化学成分与呈色机理研究. *宝石和宝石学杂志*, 2004, 6(2): 10 - 13.]
- [4] Li X Y, Wang H Z, Sun S L, *et al.* Analysis on fourier transform infrared and graphite furnace atomic absorption spectrometry of pearls with different colours [J]. *Journal of Gems & Gemology*, 2007, 9(1): 15 - 18. [李雪英, 王海增, 孙省利, 等. 不同颜色珍珠的傅里叶变换红外光谱和石墨炉原子吸收光谱分析. *宝石和宝石学杂志*, 2007, 9(1): 15 - 18.]
- [5] Zhang Y T. Study on the contribution of porphyrin and metalloporphyrin to the color of pearl and the mechanism of color rendering [D]. Beijing: China University of Geosciences, 2006. [张蕴韬. 卟啉及金属卟啉对珍珠颜色的贡献及致色机理研究. 北京: 中国地质大学, 2006.]
- [6] Barnard W, de Waal D. Raman investigation of pigmentary molecules in the molluscan biogenic matrix [J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2006, 37(1 - 3): 342 - 352.
- [7] Zhang G S. *In situ* study of carotenoids in nacre and its microstructure characteristics [D]. Guangzhou: Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, 2001. [张刚生. 珍珠层的微结构及其中类胡萝卜素的原位研究. 广州: 中国科学院广州地球化学研究所, 2001.]
- [8] Stefanos K, Emmanuel F, Jean Y M, *et al.* Role of polyenes in the coloration of cultured freshwater pearls [J]. *European Journal of Mineralogy*, 2009, 21(1): 85 - 97.
- [9] Shi L, Liu X, Mao J, *et al.* Study of coloration mechanism of cultured freshwater pearls from mollusk *Hyriopsis cumingii* [J]. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2014, 81(1): 97 - 101.
- [10] Snow M R, Pring A, Self P, *et al.* The origin of the color of pearls in iridescence from nano - composite structures of the nacre [J]. *American Mineralogist*, 2004, 89(10): 1353 - 1358.
- [11] Zhang G S. The photonic crystal structure in the ligament of *Pinctada maxima* [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52(2): 240 - 242. [张刚生. 大珠母贝韧带中的光子晶型结构. *科学通报*, 2007, 52(2): 240 - 242.]
- [12] Yan J, Hu X C, Wang J A, *et al.* Investigation on the coloring mechanism fo freshwater cultured pearls with different color [J]. *Rock and Mineral Analysis*, 2013, 32(2): 263 - 268. [严俊, 胡仙超, 王巨安, 等. 不同颜色的淡水养殖珍珠呈色机理研究. *岩矿测试*, 2013, 32(2): 263 - 268.]
- [13] Blay C, Sham K M, Vonau V, *et al.* Influence of nacre deposition rate on cultured pearl grade and colour in the black - lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera* using farmed donor families [J]. *Aquaculture International*, 2014, 22(2): 937 - 953.
- [14] Kinoshita S. Structural colors in the realm of nature [M]. Singapore: World Scientific Publishing Company. 2008: 207.
- [15] Jerry D R, Kvingedal R, Lind C E, *et al.* Donor-oyster derived heritability estimates and the effect of genotype x environment interaction on the production of pearl quality traits in the silver-lip pearl oyster, *Pinctada maxima* [J]. *Aquaculture*, 2012, 338 - 341: 66 - 71.
- [16] Wang Z Q, Han X K, Bai Z Y, *et al.* Estimates of genetic parameters for inner shell color and growth straits during one year old stage in the purple strain of *Hyriopsis cumingii* using microsatellite based parentage assignment [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(5): 644 - 650. [王照旗, 韩学凯, 白志毅, 等. 三角帆蚌紫色选育系 1 龄阶段内壳色及生长性状的遗传参数估计. *水产学报*, 2014, 38(5): 644 - 650.]
- [17] Wada K T, Komaru A. Color and weight of pearls produced by grafting the mantle tissue from a selected population for white shell color of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* (Dunker) [J]. *Aquaculture*, 1996, 142(1 - 2): 25 - 32.
- [18] McGinty E L, Evans B S, Taylor J U U, *et al.* Xenografts and pearl production in two pearl oyster species, *Pinctada maxima* and *P. margaritifera*; Effect on pearl quality and a key to understanding genetic contribution [J]. *Aquaculture*, 2010, 302(3 - 4): 175 - 181.
- [19] Gu Z F, Huang F S, Wang H, *et al.* Contribution of donor and host oysters to the cultured pearl colour in *Pinctada martensii* [J]. *Aquaculture Research*, 2014, 45(7): 1126 - 1132.
- [20] Zhu W B. Study of the effect of two shell nacre colors on the color of pearls produced by *Hyriopsis cumingii* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011. [朱文彬. 三角帆蚌两种贝壳珍珠质颜色对珍珠颜色影响的研究. 上海: 上海海洋大学, 2011.]

- [21] Liu Y. The effect of donor *Hyriopsis cumingii* on the quality of pearls [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013. [刘越. 三角帆蚌供片蚌对珍珠质量的影响. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [22] 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.
- [23] Li J L, Bai Z Y, Luo H R, *et al.* Cloning, differential tissue expression of a novel hcApo gene, and its correlation with total carotenoid content in purple and white inner-shell color pearl mussel *Hyriopsis cumingii*[J]. Gene, 2014, 538(2): 258 – 265.
- [24] Miyashita T, Takagi R. Tyrosinase causes the blue shade of an abnormal pearl[J]. Journal of Molluscan Studies, 2011, 77(3): 312 – 314.
- [25] Christensen E I, Birn H. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002, 3(4): 256 – 266.
- [26] Zheng Y, Mellem J E, Brockie P J, *et al.* SOL-1 is a CUB – domain protein required for GLR – 1 glutamate receptor function in *C. elegans* [J]. Nature, 2004, 427(6973): 451 – 457.
- [27] Bork P. Complement components C1r/C1s, bone morphogenic protein 1 and *Xenopus laevis* developmentally regulated protein UVS. 2 share common repeats[J]. FEBS Letters, 1991, 282(1): 9 – 12.
- [28] Bork P, Beckmann G. The CUB domain: a widespread module in developmentally regulated proteins[J]. Journal of Molecular Biology, 1993, 231(2): 539 – 545.
- [29] Blanc G, Font B, Eichenberger D, *et al.* Insights into how CUB domains can exert specific functions while sharing a common fold-Conserved and specific features of the CUB1 domain contribute to the molecular basis of procollagen C-proteinase enhancer-1 activity [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(23): 16924 – 16933.
- [30] Kelley L A, Sternberg M J E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server[J]. Nature Protocols, 2009, 4(3): 363 – 371.
- [31] Bai Z Y, Lin J Y, Ma K Y, *et al.* Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in the pearl mussel, *Hyriopsis cumingii*, during biomineralization[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2014, 289(4): 717 – 725.
- [32] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402 – 408.
- [33] Andersen C B F, Madsen M, Storm T, *et al.* Structural basis for receptor recognition of vitamin-B – 12 – intrinsic factor complexes [J]. Nature, 2010, 464(7287): 445 – 448.
- [34] Chamoy L, Nicolai M, Quenedey B, *et al.* Characterization of a cDNA encoding RP43, a CUB – domain-containing protein from the tube of *Riftia pachyptila* (Vestimentifera), and distribution of its transcript [J]. Biochemical Journal, 2000, 350(2): 421 – 427.
- [35] Kozyraki R. Cubilin, a multifunctional epithelial receptor: An overview [J]. Journal of Molecular Medicine, 2001, 79(4): 161 – 167.
- [36] Takeuchi T, Endo K. Biphasic and dually coordinated expression of the genes encoding major shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Marine Biotechnology, 2006, 8(1): 52 – 61.
- [37] Inoue N, Ishibashi R, Ishikawa T, *et al.* Gene expression patterns and pearl formation in the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*): A comparison of gene expression patterns between the pearl sac and mantle tissues [J]. Aquaculture, 2010, 13(1): 48 – 55.
- [38] Marin F, Luquet G, Marie B, *et al.* Molluscan shell proteins: Primary structure, origin, and evolution [J]. Current Topics in Developmental Biology, 2008, 80: 209 – 276.

Full-length cDNA cloning and expression analysis of *HcCUBDC* gene from *Hyriopsis cumingii*

LUO Hongrui¹, BAI Zhiyi^{1,2}, LIU Xiaojun^{1,2}, LI Qingqing¹, DONG Shaojian¹,
ZENG Shimei¹, LI Jiale^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resources, Ministry of Agriculture,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: This study aims to find genes related to the formation of nacre color. According to the sequence annotated from the transcriptome, the full-length cDNA sequence of *HcCUBDC* gene was cloned from *Hyriopsis cumingii* by using rapid amplification of cDNA ends (RACE) approaches. The entire *HcCUBDC* cDNA was 5 158 bp, including a 1 902 bp open reading frame (ORF) encoding a polypeptide of 639 amino acids, a 576 bp 5'UTR, and a 2 622 bp 3'UTR (GenBank accession number is KP067952). Bioinformatics analysis showed that the *HcCUBDC* gene had a signal peptide of 19 amino acids, and four CUB domains, but shared no identity with known proteins. Real-time Q-PCR revealed that *HcCUBDC* gene was ubiquitously expressed in all tissues, including anterior mantle pallial (aMP), posterior mantle pallial (pMP), mantle center (M), gill (G), foot (F), hepatopancreas (H), intestine (I) and kidney (K), with the lowest level of transcripts in H. In the purple mussels, the expression level of pMP was significantly higher compared with aMP. In the white mussels, there was no difference between aMP and pMP. *HcCUBDC* gene expression level of the pMP in purple mussels was significantly higher than that of white mussels, and there was no difference about the mRNA levels of aMP between the purple and white mussels. *In situ* hybridization showed that *HcCUBDC* mRNA was mainly expressed in outer epithelial cells at the mantle pallial. The results showed that *HcCUBDC* gene played important roles in the inner-shell color formation of *H. cumingii*, and may provide useful information for further studies on function and regulation mechanism of *HcCUBDC* gene in the color formation of the pearls.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; nacre color; *HcCUBDC* gene; sequence clone; expression

Corresponding author: LI Jiale. E-mail: jlli2009@126.com