

doi: 10.7541/2013.133

三角帆蚌钙网蛋白基因 cDNA 的全长克隆与表达分析

舒妙安 胡杭娇 陆晶莹 徐宾朋 王 岩 刘广绪 郭晓令

(浙江大学动物科学学院, 杭州 310058)

摘要: 采用同源克隆策略和 RACE 技术, 从三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)外套膜组织中成功克隆得到钙网蛋白(Calreticulin, CRT)基因的全长 cDNA 序列, 共 1838 bp, 开放阅读框为 1257 bp, 编码 418 个氨基酸, 5'端非编码区为 75 bp, 3'端非编码区为 506 bp, 基因序列提交 GenBank 的登录号为 JX416227。生物信息学分析表明, 三角帆蚌钙网蛋白基因具有一段信号肽序列、两条典型的钙网蛋白家族标签序列 KHEQNIDCGGGY 和 IMFGPDICG、三个保守的 N-、P-和 C-端功能域及内质网前导序列 HDEL。NJ 法系统进化分析显示三角帆蚌首先与海洋双壳类紧密聚在一起, 且与蚯蚓等环节动物亲缘关系较近, 聚为一支, 然后依次与虾类、昆虫、鱼类、两栖类、哺乳类聚在一起。经荧光定量 PCR 检测, 钙网蛋白基因在三角帆蚌的外套膜、闭壳肌、斧足、鳃、肝脏、性腺、心脏、肠等 8 个组织中均有表达, 其中在外套膜、鳃和斧足等与贝类钙代谢相关的组织中表达量较高预示其可能参与三角帆蚌的钙代谢。不同 Ca^{2+} 浓度处理试验的结果表明, 随着水体中 Ca^{2+} 浓度逐渐升高, 三角帆蚌钙网蛋白基因在外套膜中的表达水平呈先上升后下降的趋势, 并在 60 mg/L 时达到最高峰, 表明适宜的 Ca^{2+} 浓度可促进钙网蛋白基因表达, 而过高的 Ca^{2+} 浓度则会抑制其表达。同时在 60 mg/L Ca^{2+} 浓度条件下, 对三角帆蚌外套膜进行不同时间的表达试验, 结果表明钙网蛋白基因的表达量随时间推移先上升, 并于 48h 达到最大表达量, 而后逐渐下降。上述结果为进一步深入研究钙网蛋白基因的功能及其调控机理奠定基础。

关键词: 三角帆蚌; 钙网蛋白; RACE; 荧光定量 PCR; 组织表达

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2013)06-0999-08

钙网蛋白(Calreticulin, CRT)是内质网/肌浆网主要的 Ca^{2+} 结合蛋白, 广泛存在于真核生物细胞中, 序列高度保守、功能丰富多样。该蛋白具有钙网蛋白家族典型的三个功能结构域^[1, 2]: N-端结构域有一段信号肽、两条保守的钙网蛋白家族标签序列 KHEQNIDCGGGY 和 IMFGPDICG; P-端结构域富含脯氨酸, 并有一个高亲和性低容量的 Ca^{2+} 结合位点和两组三重复序列; C-端结构域有一个高容量低亲和性的 Ca^{2+} 结合位点和典型的内质网滞留信号肽 (K/H)DEL。作为一种多功能 Ca^{2+} 结合蛋白, 钙网蛋白不但在调控细胞内 Ca^{2+} 平衡及 Ca^{2+} 依赖的通道上起重要作用^[3], 而且具有与凝集素类似的伴侣活性, 参与多种蛋白和糖蛋白的折叠过程^[4, 5]。此外, 钙网

蛋白还影响细胞黏附^[6]、类固醇敏感性基因表达^[7]和自身免疫^[8]等过程。

近年来, Hubbard^[9]和 Somogyi, *et al.*^[10]发现钙网蛋白参与哺乳动物的牙釉质矿化, St-Arnaud, *et al.*^[11]研究表明, 钙网蛋白在调控成骨细胞的分化与功能起重要作用, Fan, *et al.*^[12]克隆得到合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)钙网蛋白基因的全长 cDNA 序列, 并研究发现其与 Ca^{2+} 转运、储存等钙代谢过程相关, 参与合浦珠母贝的生物矿化。珍珠是贝类钙代谢的生物矿化产物, 其中 95% 以上的成份是 CaCO_3 晶体, 可见 Ca^{2+} 是珍珠形成过程中的重要因子。迄今为止, 有关软体动物钙网蛋白基因的研究主要集中在合浦珠母贝、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)等海水贝

收稿日期: 2012-10-24; 修订日期: 2013-05-13

基金项目: 浙江省科技厅重大科技专项农业项目(2008C02010); 浙江省农业新品种选育重大科技专项(2012C12907-5)资助

通信作者: 舒妙安, E-mail: shuma@zju.edu.cn

类^[13, 14], 而在淡水贝类中尚未见报道。

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)生长速度快, 育珠质量好, 是我国重要的优良淡水育珠蚌^[15]。本研究通过同源克隆策略和 RACE 技术, 成功克隆得到三角帆蚌钙网蛋白基因的全长 cDNA 序列, 并分析其核苷酸和氨基酸序列, 同时采用实时荧光定量 PCR 检测三角帆蚌钙网蛋白基因在不同组织和不同时间的表达情况, 以期为进一步深入研究钙网蛋白基因的功能及其调控机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验蚌采自浙江省诸暨市山下湖三角帆蚌养殖基地, 为二龄健康育珠蚌, 经测量蚌长(13.7 ± 0.8) cm、蚌宽(3.5 ± 0.3) cm、蚌高(7.7 ± 0.5) cm 后, 置 80 cm × 80 cm 的圆形 PVC 桶中暂养一周。暂养期间, 水源采用充分曝气后的自来水, 保持水温(25 ± 1) °C, pH (7.5 ± 0.1), 溶氧(6.0 ± 0.3) mg/L, 连续充气, 每 2d 换水 1/3, 并投喂适量小球藻。在暂养结束后, 随机选取 3 只三角帆蚌, 取其外套膜、鳃、闭壳肌、斧足、肝脏、性腺、心脏、肠等组织, 经液氮速冻后保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。然后取 15 只三角帆蚌随机分成 5 组, 分别放入不同 Ca^{2+} 浓度的试验桶中, 每组 3 个重复, 试验组在曝气后的自来水中加入无水氯化钙, 使水体中的 Ca^{2+} 浓度分别为 40、60、80、100 mg/L, 对照组不添加氯化钙。在饲养一周后, 分别取三角帆蚌外套膜保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。另外再取 15 只三角帆蚌暂养一周后, 随机分成 5 组, 对照组即刻取样, 试验组放入 Ca^{2+} 浓度为 60 mg/L 试验桶中, 并分别于 24、48、96、168h 取外套膜保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。

Trizol 购自 Invitrogen 公司, PrimeScript[®] 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeScript[™] RT reagent Kit、TaKaRa pMD 19-T Vector、*E. coli* DH 5 α 、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Perfect Real Time) 购自宝生物工程(大连)有限公司, TIANGel Midi Purification Kit 购自天根生化科技(北京)有限公司, SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit、Advantage[®] 2 PCR Enzyme System 购自 BD Biosciences Clontech 公司, 无水氯化钙、无水乙醇等试剂购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成 按 Trizol 说明书提取三角帆蚌外套膜总 RNA, 分别用超微量

紫外分光光度计 Nanodrop 2000 和 1.5 % 的琼脂糖凝胶电泳检测所提总 RNA 的纯度和完整性, 按照 PrimeScript[®] 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书反转录合成 cDNA, -20 °C 保存。

钙网蛋白基因 cDNA 全长克隆和序列测定 根据同源基因克隆策略, 参照 GenBank 中已报道的合浦珠母贝(EF551334)、太平洋牡蛎(AB262086)及其他海洋双壳类的钙网蛋白基因序列, 选择保守的钙网蛋白家族标签序列设计一对简并引物 CRT-F 和 CRT-R(表 1)。PCR 反应体系: 10 × PCR Buffer (Mg²⁺ Plus) 2.5 μL , dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 2 μL , 模板 cDNA 1 μL , 上、下游引物 CRT-F 和 CRT-R (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , TaKaRa Ex Taq (5 U / μL) 0.15 μL , ddH₂O 补足至 25 μL 。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5min; 94 °C 30s, 50 °C 30s, 72 °C 1min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10min; 4 °C 保存。PCR 扩增产物经 1.5 % 的琼脂糖凝胶电泳分离检测后, 用 TIANGel Midi Purification Kit 回收、纯化, 并连接于 pMD19-T 载体, 转化到感受态细胞 *E. coli* DH 5 α , 经 LB 平板(含 Amp⁺、IPTG 和 X-gal)培养后, 进行蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆送至上海英骏生物技术有限公司测序。测序得到 362 bp 的扩增产物, 符合预期大小, 并经 BLAST 分析初步确定为钙网蛋白基因的部分序列。

根据已获得的中间片段, 分别设计 5' 和 3' 端 RACE 所需的引物, 所有引物均由上海英骏生物技术有限公司合成(表 1)。按照 SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit 操作说明书, 分别合成 5'-RACE-Ready-cDNA 和 3'-RACE-Ready-cDNA 作为模板, 并使用 Advantage[®] 2 PCR Enzyme System 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 10 × Advantage 2 PCR buffer 5.0 μL , dNTP Mix 1.0 μL , 5' RACE-Ready cDNA 或 3' RACE-Ready cDNA 2.5 μL , UPM 5.0 μL , CRT-5'GSP 或 CRT-3'GSP 1.0 μL , Advantage[®] 2 Polymerase Mix 1.0 μL , PCR-Grade Water 补足至 50 μL 。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5min; 94 °C 30s, 63 °C 30s, 72 °C 3min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10min。PCR 扩增产物的纯化、克隆、测序与中间片段克隆的步骤所述相同。

序列分析 测序结果通过 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序先进行载体序列的去除和拼接, 获得全长 cDNA 序列, 再利用 EdiSeq 程序推导其开放阅读框与氨基酸翻译。通过 ProtParam 程序(<http://expasy.org/tools/protparam.html>)、Sigal P 3.0 server 程

表 1 三角帆蚌 CRT 基因克隆与表达分析的引物
Tab. 1 Primers designed for cloning and expression analysis of CRT gene from *Hyriopsis cumingii*

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence
SMART II™ A Oligonucleotide (12 μmol/L)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG
3'-RACE CDS Primer A (3'-CDS; 12 μmol/L)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ VN (N = A,C,G,or T; V = A, G or C)
5'-RACE CDS Primer A (5'-CDS; 12 μmol/L)10 × Universal Primer A Mix (UPM)	(T) ₂₅ VN(N = A,C,G,or T; V = A, G or C)
Long Primer (0.4 μmol/L)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
Short Primer (2 μmol/L)	CTAATACGACTCACTATAGGGC
CRT-F	ATGTTTGGDCCTGATATTG
CRT-R	GTCGGGTTTCTTGGCATC
CRT-5'GSP outer	GGGTTATCAATCTGAGGTGGTTCCCAT
CRT-5'GSP inner	CATCTGGATCAGGAATGTGCTCTGGT
CRT-3'GSP outer	AAAGTAGAGGGTGGTAACCTGGA
CRT-3'GSP inner	ATAAACCAGAGCACATTCTGATC
CRT-RTF	GAAAGACATCAGGTGCAAGG
CRT-RTR	CAGGCTTCTTGGCATTGG
β-actin-RTF	CCCTCAACCCTAAAGCCAAC
β-actin-RTR	AAGCGTACAGCGACAACACA
CaM- RTF	GCCGATCAGTTGACAGAAG
CRT-RTR	TCCATTACCATCAGCATCC

序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SigalP/>)、DNAMAN、Simple Modular Architecture Research Tool(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)等软件分别预测氨基酸序列的理化性质、信号肽、二级结构、蛋白结构域等。将所得三角帆蚌钙网蛋白基因的全长 cDNA 序列提交至 NCBI BLAST 程序中进行序列比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)。利用 ClustalX 软件^[16]对相应的氨基酸序列进行多序列比对。应用 MEGA 4.0 软件^[17], 采用邻位相接法(NJ 法)构建系统发育树, 并用 Bootstrap 重复 1000 次计算各分支的置信度。

实时荧光定量 PCR 根据已获得的三角帆蚌钙网蛋白基因全长 cDNA 序列, 以及 NCBI 上公布的 β -actin (HM045420)、钙调蛋白(Calmodulin, CaM) 基因(HM483521)序列分别设计一对特异性引物用于实时荧光定量 PCR (表 1)。以各个样品的总 RNA 为模板, 按 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)操作说明反转录合成 cDNA, 并通过荧光定量 PCR 仪(ABI StepOnePlus™)测定目的基因在三角帆蚌不同组织和不同时间中的表达情况。荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL: PCR Forward Primer (10 μmol/L) 0.4 μL, PCR Reverse Primer (10 μmol/L) 0.4 μL, cDNA 2.0 μL, ROX Reference Dye (50×) 0.4 μL, SYBR® Premix Ex Taq™ (2×) 10.0 μL, ddH₂O 补足至 20 μL 体积。反应程序: 95℃ 预变性 30s; 95℃ 5s, 60℃ 30s, 40 个循环; 95℃ 15s, 60℃ 60s, 95℃ 15s。试验结果用 2^{-ΔΔC_t} 法

进行数据统计分析, 数据表示为平均值±标准差, 并采用 SPSS 16.0 软件中的单因素(One-way ANOVA)方差对试验组和对照组进行分析, 以 $P<0.05$ 为差异显著(以*表示), $P<0.01$ 为差异极显著(以**表示)。

2 结果

2.1 钙网蛋白基因 cDNA 全长扩增和序列分析

以三角帆蚌外套膜 RNA 反转录 cDNA 为模板, 采用简并引物 CRT-F 和 CRT-R 进行 RT-PCR 扩增, 获得 362 bp 的预期片段。再以通用引物 UPM 和特异性引物 CRT-5'GSP-outer、CRT-5'GSP-inner 进行巢式 PCR, 在 750—1000 bp 获得一条单一、明亮的目的条带, 经克隆测序后, 得到 808 bp 的扩增产物。同样以通用引物 UPM 和特异性引物 CRT-3'GSP-outer、CRT-3'GSP-inner 进行 3'RACE 扩增, 在 1000 bp 左右获得一条单一、明亮的目的条带, 经克隆测序后, 获得 1060 bp 的扩增产物。

通过 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序将 RT-PCR、5'RACE、3'RACE 扩增产物进行载体序列的去除和拼接, 获得三角帆蚌钙网蛋白基因 cDNA 全长序列, 共 1838 bp, 包括 1257 bp 的 ORF, 编码 418 个氨基酸, 5' UTR 为 75 bp, 3' UTR 为 506 bp, 在 polyA 上游 11 bp 处有一个多聚核苷酸加尾信号 aataaa。基因已提交 GenBank, 登录号为 JX416227。

2.2 钙网蛋白氨基酸序列组成和结构特征

利用 DNASTar 软件中的 EdiSeq 程序推导三角帆蚌钙网蛋白基因的开放阅读框与氨基酸翻译, 共有 418 个氨基酸残基, 分子量约为 49.10 kD, 理论等电点为 4.46。该蛋白中天冬氨酸(D)和赖氨酸(K)含量最高, 分别为 14.83%和 14.35%, 包含 70 个碱性氨基酸(K、R)、116 个酸性氨基酸(D、E)、98 个疏水性氨基酸(A、I、L、F、W、V)和 70 个极性氨基酸(N、C、Q、S、T、Y)。通过 NetPhos 2.0 对三角帆蚌钙网蛋白氨基酸序列的磷酸化位点进行预测, 发现其含有 16 个潜在的磷酸化位点, 包括 3 个 Ser 位点(Ser²⁷、Ser⁶⁷、Ser⁸³), 7 个 Tyr 位点(Tyr¹⁰⁷、Tyr¹²⁷、Tyr¹⁸⁰、Tyr²⁶⁸、Tyr²⁸²、Tyr²⁹⁶、Tyr³³⁵)

和 6 个 Thr(Thr³⁸、Thr⁹⁴、Thr¹³⁹、Thr¹⁷⁹、Thr²⁹⁷、Thr³⁴⁷)。利用 Signal P 4.0 在线程序预测三角帆蚌钙网蛋白的 N 端有一段由 17 个氨基酸残基构成的信号肽序列(MKMLLCI LALTVG ALAD)_o运用 ScanProsite 在线软件分析显示三角帆蚌钙网蛋白有两条典型的钙网蛋白家族标签序列(K⁹⁶HEQNIDCGGGYL¹¹¹ 和 I¹²⁸MFGPDI CG¹³⁶), 两组三重重复序列(I²⁰⁶KDPNAKKPDDWD²¹⁸、I²²³DDVNDK KPEDWD²³⁵、I²⁴⁰PDPDAKKPDDWD²⁵²、G²⁵⁷EWEPQIDNPEY²⁶⁹、G²⁷¹EWKPKQVDN PNY²⁸³、G²⁸⁵KWVHPEIDNPDY²⁹⁷)。三角帆蚌的内质网前导序列为 HDEL, 这与植物和大部分无脊椎动物一样, 而脊椎动物的内质网前导序列均为 KDEL(表 2)。

表 2 三角帆蚌与其他物种的内质网滞留信号肽和 GenBank 登录号
Tab. 2 ER retrieval signals and GenBank accession numbers of *Hyriopsis cumingii* and other species

物种 Species	内质网滞留信号肽 ER retrieval signal	GenBank 登录号 Accession number
人 <i>Homo sapiens</i>	KDEL	NP_004334.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	KDEL	AAH03453.1
野牛 <i>Bos taurus</i>	KDEL	AAC37307.1
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	KDEL	BC044068.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	KDEL	AAF13700.1
太平洋牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	KDEL	BAF63639.1
海兔 <i>Aplysia californica</i>	KDEL	AAB24569.1
蚯蚓 <i>Eisenia fetida</i>	KDEL	ABI74618.1
细粒棘球绦虫 <i>Echinococcus granulosus</i>	KDEL	ABQ96270.1
斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	HDEL	ADQ28317.1
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	HDEL	AFC34501.1
中国对虾 <i>Fenneropenaeus chinensis</i>	HDEL	ABC50166.1
菜粉蝶 <i>Pieris rapae</i>	HDEL	ACJ07154.1
拟黑多刺蚁 <i>Polyrhachis vicina</i>	HDEL	AFL48552.1
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	HDEL	BAA85379.1
冈比亚疟蚊 <i>Anopheles gambiae</i>	HDEL	AAL68781.1
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	HDEL	AAP50845.1
蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>	HDEL	XP_392689.2
合浦珠母贝 <i>Pinctada fucata</i>	HDEL	ABR68546.1
三角帆蚌 <i>Hyriopsis cumingii</i>	HDEL	JX416227.1
松材线虫 <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	HDEL	ADD82420.1
香蕉穿孔线虫 <i>Radopholus similis</i>	HDEL	AFK76483.1
秀丽隐线杆虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>	HDEL	CAA42159.1
日本血吸虫 <i>Schistosoma japonicum</i>	HDEL	AAC00515.1
曼氏血吸虫 <i>Schistosoma mansoni</i>	HDEL	AAA19024.1
莱茵衣藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	HDEL	CAB54526.1
欧洲油菜 <i>Brassica napus</i>	HDEL	AAB70919.1
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	HDEL	AAC49697.1
玉米 <i>Zea mays</i>	HDEL	AAF01470.1
旋毛虫 <i>Trichinella spiralis</i>	KEEL	XP_003371379.1
鲫锥虫 <i>Haemaphysalis longicornis</i>	HEEL	ACT78707.1
客式锥虫 <i>Trypanosoma cruzi</i>	KEDL	AAD22175.1
刚果锥虫 <i>Trypanosoma congolense</i>	KADL	AAK52926.1
肩突硬蜱 <i>Ixodes scapularis</i>	HEEL	AAT99573.1
美洲钝眼蜱 <i>Amblyomma americanum</i>	HEEL	AAC79094.1
美洲狗蜱 <i>Dermacentor variabilis</i>	HEEL	AAQ18697.1

2.3 钙网蛋白氨基酸序列同源性和进化树构建

三角帆蚌钙网蛋白基因氨基酸序列经 NCBI 中 Protein Blast 比对, 与太平洋牡蛎、合浦珠母贝、海兔(*Aplysia californica*)等海洋软体动物的相似性很高, 依次为 82%、78%、77%。其次, 与蚯蚓(*Eisenia fetida*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)等相似性也都在 73% 以上, 说明钙网蛋白序列高度保守。用 ClustalX 将三角帆蚌与其他 12 种生物的钙网蛋白基因氨基酸序列进行多重比对, 并用 MEGA 4.0 软件以邻位相接法(NJ 法)构建了钙网蛋白

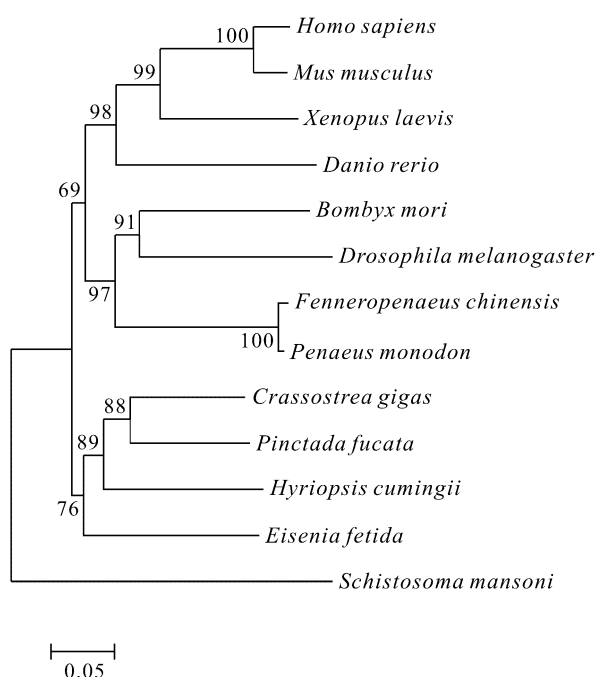


图 1 根据钙网蛋白氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树

Fig. 1 NJ phylogenetic tree of CRT amino acid sequence from *Hyriopsis cumingii* and other species

基因氨基酸的进化树(图 1), 采用 Bootstrap 重复 1000 次检验, 空位或缺失位点均当作配对删除(Par-wise deletion)处理。在该系统进化树中, 三角帆蚌首先与太平洋牡蛎、合浦珠母贝等海洋双壳类紧密聚在一起, 且与蚯蚓等环节动物亲缘关系较近, 聚为一支, 而同属无脊椎动物的昆虫纲、甲壳纲等节肢动物, 则与两栖纲、哺乳纲等脊椎动物聚为另一支, 只有曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*)处在与其他动物完

全不同的一支上, 单独聚为一支。

2.4 钙网蛋白基因的表达特征

荧光定量 PCR 结果表明, 钙网蛋白基因在三角帆蚌外套膜、闭壳肌、斧足、鳃、肝脏、性腺、心脏、肠等 8 个组织中均有表达, 但表达水平有所差异, 在肝脏中的表达量最高, 其次为外套膜、鳃和斧足, 在性腺中的表达量也较高, 而在闭壳肌、心脏、肠中的表达量较低(图 2)。不同 Ca^{2+} 浓度处理试验结果表明, 随水体中 Ca^{2+} 浓度逐渐升高, 三角帆蚌钙网蛋白基因在外套膜中的表达水平呈先上升后下降趋势, 并在 Ca^{2+} 浓度为 60 mg/L 时达到最高值。另外, 试验结果还表明钙网蛋白基因的表达水平趋势, 与具有钙代谢作用的钙调蛋白基因^[18, 19]基本一致, 但后者在 Ca^{2+} 浓度为 40 mg/L 时, 其表达量最高(图 3)。同时在 60 mg/L Ca^{2+} 浓度条件下, 对三角帆蚌外套膜进行不同时间的表达试验, 结果表明钙网蛋白基因的表达量随时间推移先上升, 并于 48h 时达到最高, 而后逐渐下降(图 4)。

3 讨论

本研究采用同源克隆策略和 RACE 技术, 以外套膜为模板, 成功获得了三角帆蚌钙网蛋白基因的全长 cDNA 序列, 共 1838 bp, 其中开放阅读框为 1257 bp, 编码 418 个氨基酸, 在淡水贝类中属首次报道。对三角帆蚌钙网蛋白的氨基酸序列进行分析, 发现其 N-端有一段信号肽序列, 为一种分泌型蛋白, 推测其由三角帆蚌外套膜合成后分泌至外套腔中, 参与珍珠形成, 此外还有两条高度保守的钙网蛋白家族标签序列, 表明该基因具有很强的保守性;

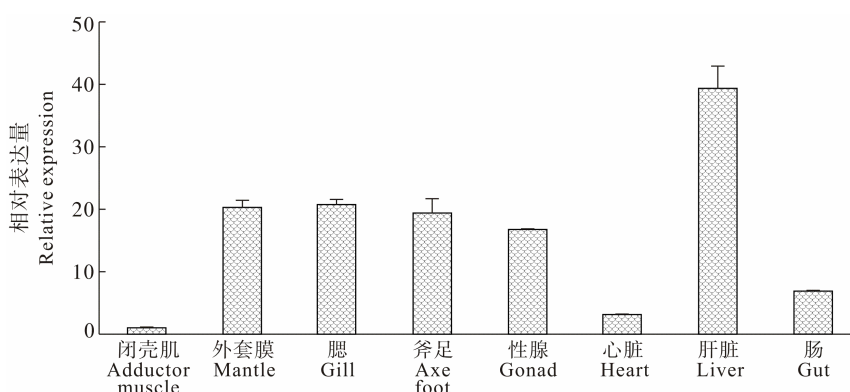


图 2 三角帆蚌钙网蛋白基因在不同组织中的相对表达量

Fig. 2 The relative expressions of CRT gene in different tissues from *Hyriopsis cumingii*

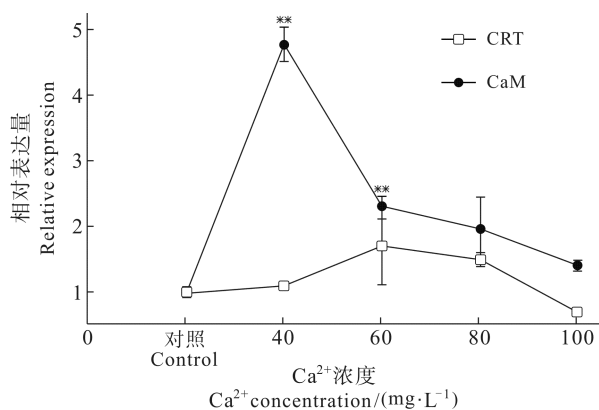


图3 三角帆蚌钙网蛋白基因和钙调蛋白基因在不同 Ca^{2+} 浓度中的相对表达量

Fig. 3 The relative expressions of CRT gene and CaM gene from *Hyriopsis cumingii* in a series of Ca^{2+} concentrations

钙调蛋白基因在 40—60 mg/L Ca^{2+} 浓度下基因表达显著上调; ** 表示同 control 相比极显著差异 ($P < 0.05$)

The mRNA expression of CaM gene was significantly up-regulated under 40—60 mg/L Ca^{2+} exposure; ** very significant ($P < 0.05$) difference vs control

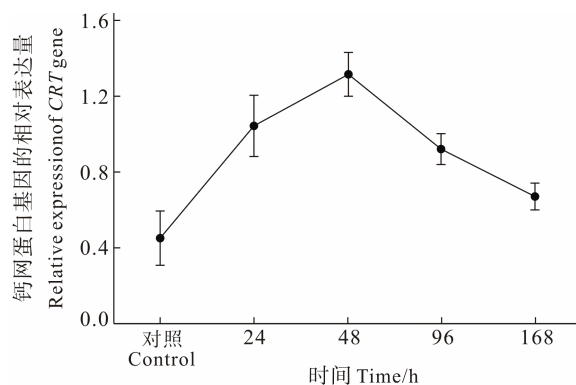


图4 三角帆蚌钙网蛋白基因在 60 mg/L Ca^{2+} 浓度条件下不同时间的表达

Fig. 4 The relative expression of CRT gene from *Hyriopsis cumingii* when Ca^{2+} concentration was 60 mg/L at different time point

P-端和 C-端分别有一个高亲和性和一个高容量的 Ca^{2+} 结合位点, 能够吸收和储存大量 Ca^{2+} , 参与了三角帆蚌的钙代谢过程。另外, C-端的最末端还有一个内质网前导序列, 其功能是靶向性地引导钙网蛋白定位于内质网^[20]。三角帆蚌的内质网前导序列是 HDEL, 与合浦珠母贝等大部分无脊椎动物和植物一样, 而同为软体动物门的太平洋牡蛎、海兔则为 KDEL, 与脊椎动物相同, 还有一些锥虫和蜉蝣的内质网前导序列为 (H/K)EEL 或 K(A/E)DL, 与上述典型的内质网前导序列不一致, 说明内质网前导序列具有种的差异性。NJ 系统进化树表明, 三角帆蚌钙网蛋白不但与太平洋牡蛎、合浦珠母贝等海水贝类钙网蛋白具有很高的相似性, 首先聚在一起, 而

且与蚯蚓等环节动物亲缘关系较近, 再聚为一支, 这与 Marcela, *et al.*^[21]的研究结果一致, 可能起源于同一祖先。

本研究以 β -actin 基因作为内参基因, 采用实时荧光定量 PCR 对三角帆蚌钙网蛋白基因在不同组织中的表达情况, 结果显示, 外套膜、闭壳肌、斧足、鳃、肝脏、性腺、心脏、肠等 8 个组织中均有表达, 说明其参与三角帆蚌多种生理功能的调节, 但在各组织中的表达量有所不同, 其中在外套膜、鳃和斧足等钙代谢活动旺盛的组织中表达量很高, 说明三角帆蚌钙网蛋白基因在 Ca^{2+} 吸收、转运与储存方面有着重要作用, 参与珍珠形成等生物矿化过程。三角帆蚌在形成珍珠时, 需要吸收大量 Ca^{2+} , 这主要是靠外套膜、鳃和斧足等与周围水环境相接触的组织直接从水体中吸获得。外套膜作为珍珠形成的部位, 其内、外表皮具有主动吸收 Ca^{2+} 和储存 Ca^{2+} 的功能, 且 Ca^{2+} 利用率高^[22]。Kirschner, *et al.*^[23]和 Coimbra, *et al.*^[24]分别利用同位素示踪及电生理学方法, 发现淡水贝类的外套膜对 Ca^{2+} 具有高度通透性。Neff, *et al.*^[25]发现不但在外套膜细胞间存在可溶性 Ca^{2+} 通道, 而且在外套膜外表皮细胞上还有另一种细胞外的 Ca^{2+} 运输途径— Ca^{2+} 结合蛋白携带 Ca^{2+} 经胞饮作用进入细胞, 然后通过胞吐作用排出 Ca^{2+} 至外套膜外腔溶液中, 参与珍珠形成。鳃作为三角帆蚌的呼吸和滤食器官, 对 Ca^{2+} 具有较强的亲和力和较高的代谢率, 是进行钙代谢过程的重要组织之一。通过鳃的水量很大, 故其比外套膜能吸收更多的 Ca^{2+} , 但其利用率没有外套膜高^[26]。斧足是三角帆蚌的运动器官。当环境安静时, 三角帆蚌会张开双壳, 伸出斧足缓行, 直接与水体接触, 因此推测其吸收 Ca^{2+} 的能力较强, 与本实验结果相符。此外, 钙网蛋白基因在肝脏和性腺中的表达量也很高, 推测这两个组织也具备珍珠生物矿化所需的生化条件, 这与施志仪等^[27]研究结果一致。

本研究有关钙网蛋白基因及钙调蛋白基因对不同 Ca^{2+} 浓度处理试验结果表明, 适宜的 Ca^{2+} 浓度能促进三角帆蚌外套膜对 Ca^{2+} 的吸收、转运与储存^[28], 而过高的 Ca^{2+} 浓度则会抑制三角帆蚌外套膜的钙代谢, 但两者表达水平有所差异, 至于在三角帆蚌不同生长发育阶段或外套膜不同位置的表达情况是否一致, 有待进一步研究。另外, 本研究还发现三角帆蚌在适宜 Ca^{2+} 浓度 (60 mg/L) 条件下, 其外套膜可通

过一些 Ca^{2+} 通道从水体中吸收 Ca^{2+} , 钙网蛋白基因表达量于 48h 达到最高值, 随后逐渐下降, 168h 后降到较低水平, 由此推测若此时再向水体中补充一定量 Ca^{2+} , 钙网蛋白基因的表达量可能会再次升高, 有利于三角帆蚌的钙代谢及其珍珠生长。珍珠的形成是个复杂精细的生物矿化过程, 水体中保持适宜的 Ca^{2+} 浓度, 是珍珠生长的必备条件。在养殖过程中通过泼洒生石灰来提高水体中的 Ca^{2+} 浓度, 以补充三角帆蚌形成珍珠所需的 Ca^{2+} 。正如本研究中不同 Ca^{2+} 浓度试验表明: 水体中适宜的 Ca^{2+} 浓度(40—60 mg/L)能促进三角帆蚌的钙代谢过程, 加快珍珠形成, 而过高的 Ca^{2+} 浓度则会抑制与钙代谢密切相关的基因在外套膜中的表达, 影响珍珠的正常生长。因此, 在水体中适量泼洒生石灰, 既能及时补充 Ca^{2+} , 又能起到消毒和杀菌的作用, 是值得提倡的做法。

致谢:

感谢浙江大学农生环测试中心生物大分子实验室高其康教授给予技术指导!

参考文献:

- [1] Michalak M, Corbett E F, Mesaeli N, *et al.* Calreticulin: one protein, one gene, many functions [J]. *Biochemical Journal*, 1999, **344**: 281—292
- [2] Baksh S, Michalak M. Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca^{2+} binding domains [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, **266**(32): 21458—21465
- [3] Michalak M, Parker J M R, Opas M. Ca^{2+} signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum [J]. *Cell Calcium*, 2002, **32**(5—6): 269—278
- [4] Trombetta E S. The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis [J]. *Glycobiology*, 2003, **13**(9): 77R—91R
- [5] Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, *et al.* Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum [J]. *Biochemical Journal*, 2009, **417**: 651—666
- [6] Coppelino M G, Woodside M J, Demarex N, *et al.* Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion [J]. *Nature*, 1997, **386**(6627): 843—847
- [7] Michalak M, Mariani P, Opas M. Calreticulin, a multifunctional Ca^{2+} binding chaperone of the endoplasmic reticulum [J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 1998, **76**(5): 779—785
- [8] Eggleton P, Llewellyn D H. Pathophysiological roles of calreticulin in autoimmune disease [J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1999, **49**(5): 466—473
- [9] Hubbard M J. Abundant calcium homeostasis machinery in rat dental enamel cells: Up-regulation of calcium store proteins during enamel mineralization implicates the endoplasmic reticulum in calcium transcytosis [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, **239**(3): 611—623
- [10] Somogyi E, Petersson U, Hulenby K, *et al.* Calreticulin—an endoplasmic reticulum resident protein is also found in the extracellular matrix [J]. *Matrix Biology*, 2003, **22**(2): 179—191
- [11] St-Arnaud R, Prud'homme J, Leung-Hagesteyn C, *et al.* Constitutive expression of calreticulin in osteoblasts inhibits mineralization [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1995, **131**(5): 1351—1359
- [12] Fan W M, Hu Y L, Li C Z, *et al.* Cloning, characterization and expression analysis of calreticulin from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. *Tsinghua Science and Technology*, 2008, **13**(4): 466—473
- [13] Kawabe S, Yoshihiro Y. Molecular cloning of calnexin and calreticulin in the pacific oyster *Crassostrea gigas* and its expression in response to air exposure [J]. *Marine Genomics*, 2010, **3**(1): 19—27
- [14] Kuhl D, Kennedy T E, Barzilai A, *et al.* Long-term sensitization training in *Aplysia* leads to an increase in calreticulin, a major presynaptic calcium-binding protein [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1992, **119**(5): 1069—1076
- [15] Li J L, Li Y S. Aquaculture in China—Freshwater pearl culture [J]. *World Aquaculture*, 2009, **40**(1): 60—62
- [16] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**(24): 4876—4882
- [17] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**(8): 1596—1599
- [18] Zeng L G, Wang J H, Li Y J, *et al.* Molecular characteristics and expression of calmodulin cDNA from the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis schlegelii* [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2012, **11**(1): 42—52
- [19] Li S, Xie L P, Ma Z J, *et al.* cDNA cloning and characterization of a novel calmodulin-like protein from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. *The FEBS Journal*, 2005, **272**: 4899—4910
- [20] Smith M J, Koch G L. Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein [J]. *The EMBO Journal*, 1989, **8**(12): 3779—3785

- 3581—3586
- [21] Marcela S, Ellen K, Petra P, *et al.* Characterization, molecular cloning and localization of calreticulin in *Eisenia fetida* earthworms [J]. *Gene*, 2007, **397**(1–2): 169—177
- [22] Tang M, Shi A J. Studies of environmental calcium concentration effect on the calcium metabolism of the mantle and pearl sac of the freshwater pearl mussel [J]. *Journal of Sichuan University* (Natural Science Edition), 2000, **37**(5): 741—747 [唐敏, 石安静. 环境钙浓度对淡水育珠蚌外套膜及珍珠囊钙代谢的影响. 四川大学学报(自然科学版), 2000, **37**(5): 741—747]
- [23] Kirschner L B, Sorensen A L, Kriebel M. Calcium and electric potential across the clam mantle [J]. *Science*, 1960, **131**(3402): 735
- [24] Coimbra J, Machado J, Fernandes P L, *et al.* Electrophysiology of the mantle of *Anodonta cygnea* [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1988, **140**: 65—88
- [25] Neff J M. Ultrastructural studies of the outer epithelium of the mantle in the clam *Meremaria mercenaria* in relation to calcification of the shell [J]. *Tissue and Cell*, 1972, **4**(4): 591—600
- [26] Li J, Shi A J, Mo S W, *et al.* Metabolism and distribution of calcium in *Anodonta woodiana pacifica* (Heuda) traced by ^{45}Ca [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26**(2): 188—191 [李静, 石安静, 莫尚武, 等. ^{45}Ca 在圆背角无齿蚌体内的代谢与分布. 水生生物学报, 2002, **26**(2): 188—191]
- [27] Shi Z Y, Xie X Z, He X J. Study on the biological characteristic of part culturing peal in visceral mass of *Hyriopsis cumingii* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008, (3): 178—181 [施志仪, 谢先中, 何秀娟. 三角帆蚌内脏团珍珠培育部位的生物性状研究. 生物技术通报, 2008, (3): 178—181]
- [28] Li W J, Shi Z Y, Hao Y Y, *et al.* Research of calcium flux by ion-selective microelectrodes in mantle tissue of *Hyriopsis cumingii* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(3): 545—549 [李文娟, 施志仪, 郝莹莹, 等. 运用微电极技术测定三角帆蚌外套膜 Ca^{2+} 流量的研究. 水生生物学报, 2011, **35**(3): 545—549]

FULL-LENGTH cDNA CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF CALRETICULIN GENE FROM *HYRIOPSIS CUMINGII*

SHU Miao-An, HU Hang-Jiao, LU Jing-Ying, XU Bing-Peng, WANG-Yan, LIU Guang-Xu and GUO Xiao-Ling
(College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: The full-length cDNA sequence of Calreticulin *CRT* gene was isolated from the mantle of *Hyriopsis cumingii* by using homology cloning strategy and SMART RACE technique. The entire *CRT* cDNA was 1838 bp, containing a 1257 bp complete open reading frame which encoding a protein with 418 amino acids, a 75 bp 5' UTR, and a 506 bp 3' UTR (GenBank accession number is JX416227). Bioinformatics analysis indicated that the *calreticulin* gene had a signal peptide, two typical calreticulin family labels (KHEQNIDCGGGY and MFGPDICG), three conserved domains (N-, P-, and C-), and the endoplasmic reticulum retrieval sequence HDEL. Phylogenetic analysis indicated that the *CRT* gene of *H. cumingii* was closely related to seawater bivalves, followed by that of annelidas and then fish, amphibians, and mammals. Real-time PCR revealed that *CRT* gene was ubiquitously expressed in all tested tissues, but far more abundant in tissues that closely relating to calcium metabolism such as mantle, gill and foot. This result indicates an intrinsic relationship between *CRT* gene and calcium metabolism in *H. cumingii*. When exposed to a serie of increasing Ca^{2+} , the mRNA expression of *CRT* gene in mantle was shown to be bell-shaped, ascending when Ca^{2+} concentration was less than 60 mg/L and descending when Ca^{2+} concentration was greater than 60 mg/L. The result that *CRT* gene expression reached its maxium when exposed to 60 mg/L Ca^{2+} , suggesting appropriate Ca^{2+} concentration would stimulate the expression of *CRT* gene. Moreover, as the Ca^{2+} (60 mg/L) exposure time increased, the *CRT* gene expression in mantle was shown to increase initially, reach its peak at 48h, and then decrease subsequently. The results of present study will provid useful information for further studies on function and regulation mechanism of *CRT* gene.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; Calreticulin; RACE; Real-time PCR; Tissue expression