

三角帆蚌新发现的贝壳基质蛋白基因*hic9*的分离、鉴定及其在珍珠早期形成过程中的作用

刘晓军^{1,2,3}, 郭 炜¹, 金 参¹, 白志毅¹, 李家乐^{1,4*}

(1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

4. 上海海洋大学E研究院, 上海 201306)

摘要:为进一步研究珍珠质形成的分子机理, 使用RACE-PCR技术从三角帆蚌外套膜中克隆到一个新的贝壳基质蛋白基因*hic9*。RT-PCR和原位杂交技术结果显示, *hic9*主要在闭壳肌和外套膜中表达, 且在外套膜外褶的外表皮各部分都有信号, 在壳皮沟中同样有信号, 这些结果表明, *hic9*是一个同时参与了贝壳角质层、棱柱层和珍珠层形成的多功能基质蛋白基因。*hic9*富含甘氨酸(14.81%)、脯氨酸(13.58%)和丙氨酸(12.35%), 在序列中部形成“Gly-X-X”的结构(X为任意氨基酸), 与近C末端连续重复丙氨酸结构(polyA)一起使*hic9*具有类似蛛丝蛋白的结构特征。*hic9* C末端由一段疏水性序列“LAWMLFV”组成, 推测这段序列形成 β 折叠结构, 紧邻该序列89~91位是“Asp-Leu -Asp”序列, 这是一个典型的Ca²⁺结合位点。此外, 通过实时定量PCR检测了珍珠形成早期阶段*hic9*在初生珍珠囊中的表达情况, 插片后3~15 d *hic9*在珍珠囊中的表达水平维持在大致相同的表达水平, 在碳酸钙沉积物从无序向有序转变时期(18~25 d), 表达水平较第15天有显著的升高, 这表明*hic9*参与了这一过程, 在珍珠层的形成过程中发挥了关键作用。

关键词:三角帆蚌; 生物矿化; 贝壳基质蛋白; 珍珠层; 珍珠

中图分类号: Q 786; S 966.22

文献标志码: A

自然界在进化演变进程中, 软体动物从外界水环境中摄取无机离子, 并在有机大分子的严格调控下, 经历核化、生长和变相等步骤, 最终形成了结构高度有序且机械性能优异的贝壳, 为内脏团提供了有效的支撑和保护^[1]。与此类似, 当砂砾或者虫卵等异物侵入并刺激部分外套膜上皮细胞在结缔组织中形成珍珠囊, 而后分泌有机基质调控碳酸钙晶体沉积形成珍珠^[2]。贝壳和珍珠作为典型的生物矿物, 是外套膜上皮细胞分泌有机基质调控碳酸钙晶体沉积的产物。二者的钙化层主要由珍珠层组成, 其中碳

酸钙晶体大约占其体积的95%, 而几丁质、蛋白质等生物大分子仅占5%左右^[3]。尽管贝壳有机基质中还含有多糖及脂类, 但主要是蛋白质, 对碳酸钙生物矿化起调控作用的也主要是这些蛋白, 被总称为基质蛋白(matrix proteins)。其中, 不可溶基质蛋白和几丁质共同参与疏水性有机框架的搭建; 丝状蛋白填充于有机框架; 酸性可溶蛋白则暴露在几丁质框架外, 诱导碳酸钙的成核并调控其生长^[4]。因此, 珍珠形成机制主要就是有机基质对无机矿物的调控。

在珍珠产业中, 根据珍珠囊的形成原理, 通

收稿日期: 2017-11-01 修回日期: 2018-03-19

资助项目: 国家自然科学基金(31272654); “十二五”国家科技支撑计划(2012BAD26B04); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-49)

通信作者: 李家乐, E-mail: jlli@shou.edu.cn

常将供片蚌的外套膜制成小片,将其植入受体蚌外套膜的结缔组织,以此促进珍珠囊形成并分泌珍珠质。三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)作为我国主要的淡水珍珠蚌,所产的无核珍珠占总育珠量的95%,但产值仅占全球珍珠总产值的10%。影响珍珠质量的主要因子有珍珠的大小(规格)、光泽、形状、光洁度、颜色、有核珍珠珍珠层厚度等6个方面^[5]。珍珠的大小(有核珍珠珍珠层厚度)是影响珍珠质量的首要因素,除了受品种、环境因素以及营养条件影响外,从微观角度来看,其最主要的影响因素就是珍珠囊中CaCO₃的沉积速率,CaCO₃沉积速率越快,则相同生长周期中珍珠越大,珍珠层越厚。以往的研究表明,基质蛋白能够调控CaCO₃沉积的速率,如Nacrein在很多种类中存在,能抑制CaCO₃沉积^[6],p10^[7]、MSI7^[8]能促进CaCO₃沉积。同时淡水珍珠的光泽受到球文石的影响,不同类型珍珠的组分分析结果显示,球文石珍珠中有机基质的含量要高于文石珍珠^[9]。其中,球文石珍珠的酸性可溶有机基质可以诱导生成球文石,而文石珍珠的水溶性有机基质可以诱导生成文石晶体^[10]。现有的研究表明,文石的形成同样受到基质蛋白的调控^[11]。因此,加强珍珠形成过程中的分子调控机理研究对提高珍珠质量具有重要意义。

目前,已经从三角帆蚌贝壳中分离鉴定了若干基质蛋白,Nacrein^[12]、Hcperlucin^[13]、HcCA^[14]、Silkmapin^[15]、Hic22^[16]、Hic31^[17]、Hic52^[18]、Hic74^[19]。这些基质蛋白在控制碳酸钙沉积速率、调控晶体形态等方面具有重要作用,并参与调控了珍珠矿化过程中珍珠质的沉积。本实验从三角帆蚌外套膜中分离鉴定了基质蛋白基因*hic9*,结合组织定量、原位杂交和珍珠形成过程中的表达分析,研究了*hic9*在贝壳及珍珠矿化过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验所用的三角帆蚌采购于浙江金华武义县,在实验室适应性暂养2周后,挑选健康的个体。取斧足、闭壳肌、外套膜、性腺、肝胰腺、血液及鳃等组织进行液氮冻存。其中,抽取的血液于4℃,12 000 r/min,离心5 min,弃上清液后加入1 mL Trizol,冻存于-80℃。

1.2 总RNA提取及第一链cDNA合成

运用Trizol法对三角帆蚌的各个组织进行RNA提取,用Nanodrop 2000分光光度计对所提RNA的浓度进行检测,并用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的质量。将检测合格的各组织的RNA进行等量混合后,再用SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 日本)进行cDNA第一链的合成。

1.3 *hic9*基因克隆

根据MSI60的“AAAAAA”序列设计5'RACE简并引物“GCXGCGXGCGXGCGXGCGX”(X=A或C或T或G),进行PCR扩增。然后根据5'RACE产物设计3'RACE引物“GGCGTGGCACTGTC-AG”,进行PCR扩增。将5'RACE和3'RACE的产物拼接并验证正确就获得了要克隆的序列。

1.4 序列生物信息学分析

使用ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)软件对*hic9*基因的ORF和编码的氨基酸进行预测;使用SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对其信号肽进行预测;使用SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测结构域;使用ExPASy-ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)对氨基酸序列的理化性质进行分析;利用Phyre2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)对该蛋白的高级结构进行预测。

1.5 *hic9*基因在各组织表达分析

包括斧足、闭壳肌、外套膜、性腺、肝胰腺、血液及鳃在内的7个组织RNA反转录成cDNA。参照*hic9*的序列信息,设计组织定量所需的引物序列Hic-RT-F、Hic-RT-R,其中EF-1a为内参基因(表1)。反应体系为10 mL 2R组Taq master mix, 1 mL上、下游引物, 2 mL cDNA模板, 6 mL ddH₂O;反应程序: 94℃预变性5 min; 95℃变性5 min, 58℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 35个循环。随后将PCR产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。

1.6 原位杂交

根据已知的cDNA序列,设计原位杂交引物Hic-ISH-F、Hic-ISH-R(表1),对外套膜cDNA进行扩增,并将扩增后的PCR产物进行割胶回收(天根,北京)。参照T7 High Efficiency Transcription

表1 实验中所用的引物

Tab. 1 The primers used in the experiment

引物名称 primer name	序列信息(5'-3') sequence information (5'-3')	应用 usage
5 RAP	G CXGCXGCXGCXGCXGCX (X=A或C或T或G)	5'RACE
3 RAP	GGCGTGGCACTGTCAG	3'RACE
Hic-RT-F	TGCCACCTGCTGAATATCCC	RT-PCR
Hic-RT-R	TCCAGGCTAAGTTGTCATCGAG	RT-PCR
Hic-ISH-F	ATGAAGACACTTCTGGCATTCT	ISH
Hic-ISH-R	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGTTATACAAATAGCATCCAGGCTAAG	ISH
EF-1a-F	GGAACTTCCCAGGCAGACTGTGC	qRT-PCR
EF-1a-R	TCAAAAACGGGCCGAGAGAAT	qRT-PCR

Kit (全式金, 北京)说明书对PCR产物进行T7转录。反应体系为12 mL模板(20 ng/mL), 4 mL 5T7 Transcription Reaction Buffer, 2 mL 10'RNA Labeling Mix (Roche, 瑞士), 2 mL T7 Transcription Enzyme Mix。混合均匀后, 37 °C, 2 h。

取三角帆蚌外套膜组织, 浸泡于4%多聚甲醛(含DEPC)溶液中6 h, 然后再将组织浸泡于25%的蔗糖溶液, 过夜24 h, 等组织完全沉底后, 用冰冻切片对外套膜组织进行冰冻切片。参照DIG nucleic acid detection kit (Roche, 瑞士)说明书进行原位杂交并拍照记录。

1.7 珍珠形成早期表达分析

选取2龄且规格大小约为8 cm的三角帆蚌制片, 并将制备好的外套膜小片移植到相同规格受体蚌的外套膜中, 而后将实验个体放入网箱中吊养。在插片后的第3、5、8、11、15、18、25天7个时间点随机选取3个个体, 对珍珠囊取样提取RNA并反转录成cDNA。qRT-PCR反应体系: 10 mL 2 × SYBR qPCR super mix (近岸, 江苏), 0.8 μL上、下游引物, 2.0引物, PCR super (ng/μL), 6.4 μL ddH₂O。反应程序: 94 °C预变性5 min, 40个循环的95 °C 15 s, 58 °C 45 s, 最后温度从65 °C上升到95 °C并绘制熔解曲线。以2^{-ΔΔCt}等式计算各个时间点的相对表达量, 并使用SPSS 18.0对其进行显著性分析($P < 0.05$ 为差异显著)

2 结果

2.1 hic9的克隆与序列特征分析

通过将5'RACE和3'RACE产物序列拼接得

到了一段662 bp的核酸序列, 该序列含一个长为303 bp的ORF序列, 编码一个含100个氨基酸的蛋白, 该蛋白序列前19个氨基酸“MKTLLAFLVTL-ALVCHVTG”为信号肽序列(图1)。去除信号肽后, 整个蛋白序列含有81个氨基酸, 分子量为8.651 ku, 由于在GenBank里没有检测到同源性蛋白, 表明为一个新发现的蛋白, 命名为hic9。

hic9成熟蛋白共由15种氨基酸组成(表2), 含有6个强酸性氨基酸(D、E), 同时有6个强碱性氨基酸(K、R), 总体呈弱酸性, 等电点(pI)为6.466。此外, 各种氨基酸的含量并不平均, 其中甘氨酸(14.81%)、脯氨酸(13.58%)和丙氨酸(12.35%)含量最高, 均在10%以上, 接近10%的还有亮氨酸(9.88%)、甲硫氨酸(9.88%), 这5种氨基酸占整个序列氨基酸总数的60.5%。氨基酸序列的二级结构分析表明hic9 N末端和C末端结构比较规则, N末端“MRRQNNMELLRRLM”序列形成α螺旋结构, 在C末端疏水性序列“LAWMLFV”形成β折叠结构(图2)。

2.2 半定量PCR检测hic9在各组织中的表达

选取了斧足、闭壳肌、外套膜、性腺、肝胰腺、血液及鳃这7个组织, 选取EF-1a为参比, 使用半定量PCR的方法检测了hic9在以上各组织中的表达情况。hic9在闭壳肌和外套膜中表达量最高, 在其余各组织中只有微量的表达(图3)。

2.3 原位杂交检测hic9基因在外套膜中的表达

外套膜是与贝壳形成相关的特化组织, 所以为了确定hic9基因是否与贝壳的形成相关, 选用原位杂交检测hic9基因在外套膜组织中的表达

```

1
29 ATG AAG ACA CTT CTG GCA TTT CTG GTG ACC TTG GCT CTA GTC TGT CAT GTG ACT GGA
1 M K T L L A F L V T L A L V C H V T G
86 CAA GAT ATG AGG AGG CAG AAC AAC ATG GAA TTA TTA CGT CGT CTC ATG GGA AAT GCA
20 Q D M R R Q N N M E L L R R L M G N A
143 CCA GCA CCA TCT GGT CCT GGT CCT AGG GGC CCC ATG GTA GGT GGA GGG CCG GTC GCC
39 P A P S G P G P R G P M V G G G P V A
200 GGA ATG CCA CCT GCT GAA TAT CCC AAT CCC TAC TGG GGT TCA CCG TTG GGA GGC CGA
58 G M P P A E Y P N P Y W G S P L G G R
257 AAC TGG ATG ATG GGC GCC GCA GCC GCT AAC GCT CTC GAT CTC GAT GAC AAC TTA GCC
77 N W M M G A A A A N A L D L D D N L A
314 TGG ATG CTA TTT GTA TAA ACTGACAGTGCCACGCCCTTTGGACTCTTTGGCTCCGAGATTCCAATTTATAAAATATATCTGTGATCTTCCAAT
96 W M L F V *
407 CAGATTGCAAGGTTGTTATATTATGCAAGGTAATAAAAAATAATTTAGGGCAACAGCTTCGGAAATATTTCTTTATAAAACTGCATTGTTGCCTGCATATTTTACATA
517 TTAACAAAATTGATAGACATTTTCTGACGTAGCGATCGTCATCAGTACGCTTGACGGAGATATGTGGATACAAGATTGTTTGTGCAAAATCGATTTTGTAAATTTAAATG
627 AAATAAAATCTGTTAATGATACTACAAAAA

```

图1 *hic9*的cDNA及其ORF编码的氨基酸序列

下划横线的氨基酸序列为信号肽。该序列已经在GenBank中注册

Fig. 1 cDNA and deduced amino acid sequence of *hic9*

Underlined. putative signal peptide; The cDNA sequence of *hic9* was submitted to GenBank (accession no. MF508725)

表2 *hic9*蛋白序列(去除信号肽)氨基酸组成

Tab. 2 Amino acid composition of *hic9* protein sequence (signal peptide removed)

氨基酸 amino acid	蛋白序列中数量/个 number in the protein sequence	占蛋白总序列百分比/% percentage of total protein sequences
甘氨酸(Gly, G)	12	14.81
脯氨酸(Pro, P)	11	13.58
丙氨酸(Ala, A)	10	12.35
亮氨酸(Leu, L)	8	9.88
甲硫氨酸(Met, M)	8	9.88
天冬酰胺(Asn, N)	7	8.64
精氨酸(Arg, R)	6	7.41
天冬氨酸(Asp, D)	4	4.94
色氨酸(Trp, W)	3	3.70
缬氨酸(Val, V)	3	3.70
谷氨酰胺(Gln, Q)	2	2.47
谷氨酸(Glu, E)	2	2.47
丝氨酸(Ser, S)	2	2.47
酪氨酸(Tyr, Y)	2	2.47
苯丙氨酸(Phe, F)	1	1.23

部位。信号主要在外套膜外褶(OF)的外侧表皮细胞中出现, 其中外套膜外褶外侧中部、缘膜部和边缘都有很强烈的信号(图4, 箭头所示)。除此之外, 在外套膜外褶和中褶(MF)之间的壳皮沟也出现了明显的信号。通过对信号的比较可以

发现, 外套膜外表皮中部包括缘膜部的信号明显比边缘部信号强烈。

2.4 实时定量PCR检测在珍珠形成早期阶段*hic9*基因在珍珠囊中的表达

为了进一步研究*hic9*基因的功能, 使用实时定量PCR检测了在珍珠形成早期阶段(3~25 d), *hic9*在初生珍珠囊中的表达情况。在珍珠囊形成的初期乃至珍珠沉积的早期阶段, 3~15 d *hic9*基因在珍珠囊中的表达水平都没有显著的变化, 维持在大致相同的表达水平, 但在插片后第18天时, *hic9*基因在珍珠囊中的表达水平与第15天时相比有了显著的升高($P < 0.05$), 第25天时*hic9*基因在珍珠囊中维持较高的表达量(图5)。

3 讨论

贝壳基质蛋白是一类特殊的能够指导贝壳和珍珠矿化的生物大分子, 在已发现的基质蛋白功能中, 基质蛋白可以调控CaCO₃晶体速率, 控制碳酸钙的晶型, 在贝壳和珍珠的形成过程中发挥了非常重要的作用。本研究从三角帆蚌外套膜中分离得到了一个新的蛋白基因*hic9*, 该基因翻译的蛋白N端具有一个19个氨基酸“M-KTLLAFLVTLALVCHVTG”组成的信号肽, 表明该基质蛋白是一个分泌蛋白。通过组织表达分析, 可以发现*hic9*在闭壳肌和外套膜中表达量很高, 表明其参与了贝壳形成。为了进一步确认该蛋白是否为一个基质蛋白, 利用其探针进行

Secondary structure and disorder prediction

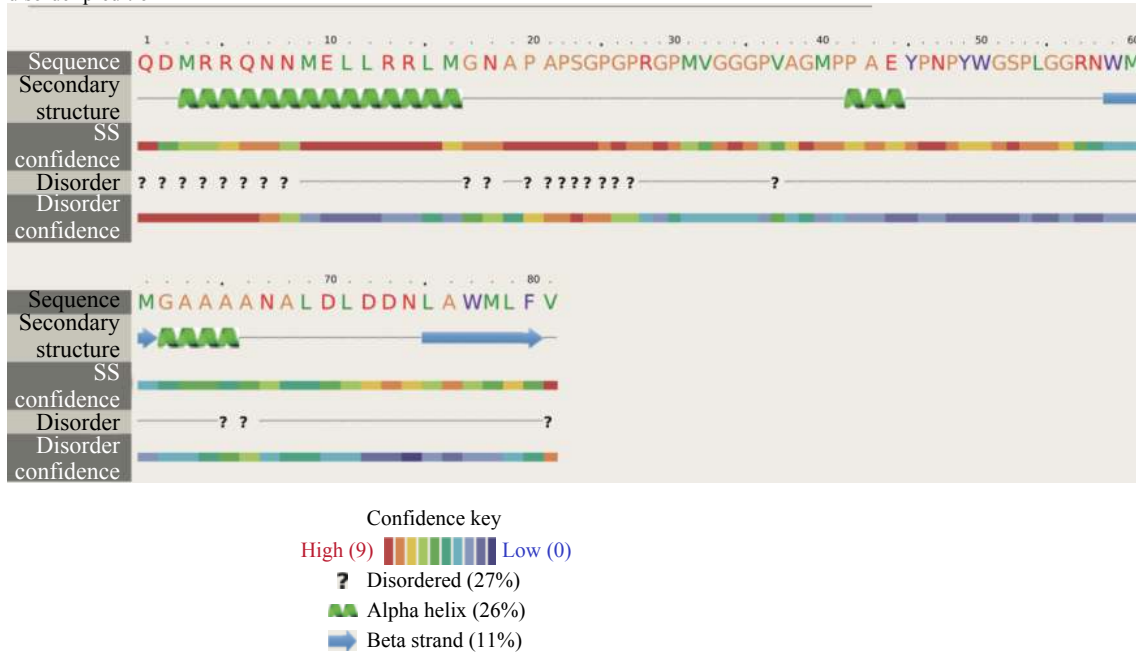


图 2 hic9二级结构推测

基于hic9蛋白氨基酸序列使用Phyre²推测其二级结构

Fig. 2 Secondary structure prediction of hic9

Based on the protein sequence of hic9, the secondary structure prediction is performed by Phyre²

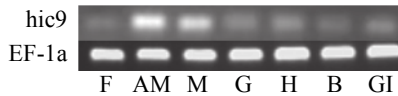


图 3 半定量PCR检测在各组织中表达的电泳图

F. 斧足; AM. 闭壳肌; M. 外套膜; G. 性腺; H. 肝胰腺; B. 血液; GI. 鳃

Fig. 3 Tissue-specific expression of hic9 by semi-quantitative PCR

F. foot; AM. adductor muscle; M. mantle; G. gonad; H. hepatopancreas; B. blood; GI. gill

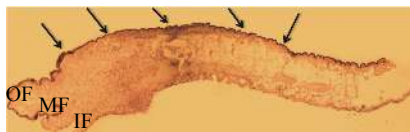


图 4 原位杂交检测hic9基因在外套膜组织中的表达

IF. 内褶; MF. 中褶; OF. 外褶

Fig. 4 In situ hybridization analysis of hic9 gene expression in H. cumingii mantle

IF. inner fold; MF. middle fold; OF. outer fold

除了外套膜原位杂交检测, 从原位杂交的结果来看, 其mRNA信号主要出现在外套膜外褶整个上表皮, 外套膜外褶上表皮是负责分泌形成贝壳

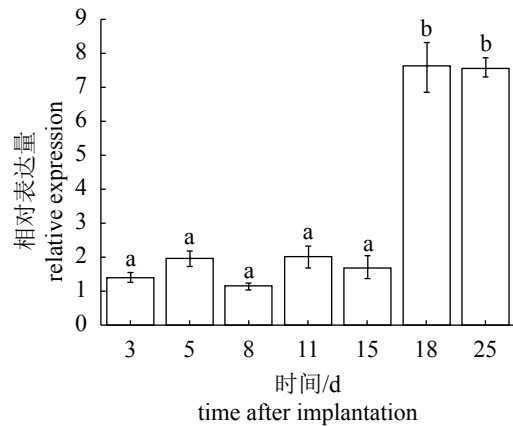


图 5 hic9基因在早期珍珠囊中相对表达量

不同字母代表存在显著性差异(P<0.05)

Fig. 5 Relative expression of hic9 in pearl sac during early stages of pearl formation after implantation

The different letters mean significant difference (P<0.05)

的组织, 具有区域化的特点^[20], 边缘区的细胞负责棱柱层的矿化, 从边缘区往较合线的方向分别是缘膜部和中心区, 这2个区域都负责珍珠层的矿化, 原位杂交的结果表明, hic9同时参与了棱柱层和珍珠层的形成。在壳皮沟也发现了hic9的信号, 表明hic9还参与了角质层的形成。这些

研究均表明*hic9*是一个多功能的贝壳基质蛋白,参与了整个贝壳各个不同结构的形成。

*hic9*的氨基酸组成具有典型的基质蛋白的特点。首先表现为富含特定的氨基酸。已发现的三角帆蚌贝壳基质蛋白大多具有这种特点,如silkmapin和*hic31*富含甘氨酸,含量分别达到34.41%^[15]和26.67%^[17],*hic52*富含甘氨酸和谷氨酰胺,二者之和占整个氨基酸序列的40.2%^[18],*hic74*富含丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸,三者之和占整个氨基酸序列的67.2%^[19]。*hic9*由15种氨基酸组成,但甘氨酸、脯氨酸和丙氨酸在整个序列中含量都在10%以上,三者之和占整个序列的40.74%,接近10%的还有亮氨酸(9.88%)、甲硫氨酸(9.88%),这5种氨基酸占整个序列氨基酸总数的60.5%;其次是氨基酸在整个序列中的分布具有不均衡性,呈区域化分布(图1),主要表现为碱性氨基酸主要分布于N末端,酸性氨基酸主要分布于靠近C末端的位置,C末端由一段疏水性序列“LAWMLFV”组成,甘氨酸和脯氨酸分布于靠N末端的中部序列,丙氨酸在靠近C末端的中部序列形成polyA的结构。二级结构分析表明,*hic9*N末端“MRRQNNMELLRRLM”序列形成 α 螺旋结构,在C末端疏水性序列“LAWMLFV”形成 β 折叠结构。甘氨酸和脯氨酸虽然含量最多,但基本都集中在序列中部,形成“GPX”、“GXP”和“G_nP”(n为任意数)的局部规律结构,“GPX”、“GXP”(X为任意氨基酸)类似于胶原蛋白的基本单元,以上结构包括“GGR”都可以归为“GXX”的结构(X为任意氨基酸),与靠近C末端的连续重复丙氨酸结构(polyA)一起构成了类似蛛丝蛋白的结构特征^[20]。酸性氨基酸虽然含量很少,但序列89~91位“DLD”的结构形成了典型的钙离子结合位点,Mann^[21]认为“Asp-X-Asp”可以为钙离子的结合提供理想的位点,所以可以推测*hic9*主要由靠近C末端的“DLD”提供钙离子的结合位点,在矿化过程中*hic9*疏水的C末端可能以某种机制嵌入有机框架,而紧邻C末端的“DLD”暴露在矿化环境中,通过该位点富集Ca²⁺,为碳酸钙的生物矿化提供成核位点。该结构特点类似于silkmapin,都是在靠近C末端的位置有Ca²⁺结合位点,silkmapin的“Asp-X-Asp”结构位于C末端,直接暴露在矿化环境中,而*hic9*的“Asp-X-Asp”结构外还有一个疏水的 β 折叠结构。

珍珠形成是在基质蛋白指导下进行的生物

矿化过程,本研究通过实时定量PCR检测了在珍珠形成早期阶段*hic9*基因在初生珍珠囊中的表达情况。3~15 d内*hic9*基因在珍珠囊中的表达水平维持在大致相同的表达水平,插片后第18天时表达水平与第15天时相比有了显著的升高($P<0.05$),第25天时表达水平与第18天时没有显著差异。关于早期珍珠的形成,Liu等^[22]在合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)中的研究表明,在珍珠的形成过程中,矿物质的沉积经历2个阶段:无序沉积和有序沉积,在珠核表面被珍珠层覆盖之前,珠核表面的沉积物经历了一个从无到有,从无序到有序的过程,最终形成珍珠层。基质蛋白在珍珠囊的整个发育阶段表达的研究结果表明,基质蛋白指导了珠核表面的碳酸钙沉积,基质蛋白的调控导致了珠核表面的沉积从无序转为有序,并最终形成珍珠层^[22]。董绍建^[23]在三角帆蚌无核珍珠的形成过程中也观察到类似的现象,在插核后0~15 d,珍珠表面沉积的颗粒粗糙,凹凸不平,从观察记录的第19天开始,珍珠颗粒的表面有扁平状的不规则文石晶体颗粒堆积在上面,之后逐渐规整至沉积规则的珍珠层。*hic9*基因在第18天时表达水平有显著的上升,表明*hic9*基因参与了珍珠表面沉积物从无序状态向有序状态的转变,在珍珠表面珍珠层的形成过程中发挥了关键作用。

参考文献:

- [1] Simkiss K, Wibur K M. Biomineralization: Cell biology and mineral deposition[M]. San Diego: Academic Press, 1989.
- [2] 石安静,张矛,吴中文,等.三角帆蚌珍珠囊形成的研究[J].水产学报,1985,9(3):247-253.
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(in Chinese).
- [3] Lowenstam H A, Weiner S. On biomineralization[M]. New York: Oxford University Press, 1989.
- [4] Addadi L, Joester D, Nudelman F, et al. Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes[J]. Chemistry: A European Journal, 2006, 12(4): 980-987.
- [5] 李家乐,刘越.影响养殖珍珠质量的主要因子[J].水产学报,2011,35(11):1753-1760.
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(in Chinese).
- [6] Miyamoto H, Miyoshi F, Kohno J. The carbonic anhydrase domain protein nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusc *Pinctada fucata*[J]. *Zoological Science*, 2005, 22(3): 311-315.
- [7] Zhang C, Xie L P, Huang J, *et al.* A novel matrix protein family participating in the prismatic layer framework formation of pearl oyster, *Pinctada fucata*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 344(3): 735-740.
- [8] Zhang Y, Xie L P, Meng Q X, *et al.* A novel matrix protein participating in the nacre framework formation of pearl oyster, *Pinctada fucata*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 135(3): 565-573.
- [9] Ma Y F, Berland S, Andrieu J P, *et al.* What is the difference in organic matrix of aragonite vs. vaterite polymorph in natural shell and pearl? Study of the pearl-forming freshwater bivalve mollusc *Hyriopsis cumingii*[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2013, 33(3): 1521-1529.
- [10] Ma Y F, Qiao L, Feng Q L. In-vitro study on calcium carbonate crystal growth mediated by organic matrix extracted from fresh water pearls[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2012, 32(7): 1963-1970.
- [11] Samata T, Hayashi N, Kono M, *et al.* A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*[J]. *FEBS Letters*, 1999, 462(1-2): 225-229.
- [12] 韩健, 李文娟, 施志仪, 等. 三角帆蚌Nacrein基因克隆、蛋白提纯及其对珍珠晶体成型的影响[J]. *生物技术通报*, 2010(12): 137-141.
- Han J, Li W J, Shi Z Y, *et al.* Nacrein gene clone, protein extraction and its effect on crystal growth in *Hyriopsis cumingii* Lea[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(12): 137-141(in Chinese).
- [13] Lin J Y, Ma K Y, Bai Z Y, *et al.* Molecular cloning and characterization of perlucin from the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis cumingii*[J]. *Gene*, 2013, 526(2): 210-216.
- [14] Ren G, Wang Y, Qin J G, *et al.* Characterization of a novel carbonic anhydrase from freshwater pearl mussel *Hyriopsis cumingii* and the expression profile of its transcript in response to environmental conditions[J]. *Gene*, 2014, 546(1): 56-62.
- [15] Liu X J, Dong S J, Jin C, *et al.* Silkmapin of *Hyriopsis cumingii*, a novel silk-like shell matrix protein involved in nacre formation[J]. *Gene*, 2015, 555(2): 217-222.
- [16] Liu X J, Jin C, Wu L M, *et al.* Isolation and characterization of a novel acidic matrix protein hic22 from the nacreous layer of the freshwater mussel, *Hyriopsis cumingii*[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2016, 15(3): gmr.15038656.
- [17] Liu X J, Zeng S M, Dong S J, *et al.* A novel matrix protein Hic31 from the prismatic layer of *Hyriopsis cumingii* displays a collagen-like structure[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135123.
- [18] Liu X J, Pu J W, Zeng S M, *et al.* *Hyriopsis cumingii* Hic52-A novel nacreous layer matrix protein with a collagen-like structure[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 102: 667-673.
- [19] Liu X J, Jin C, Wu L M, *et al.* Hic74, a novel alanine and glycine rich matrix protein related to nacreous layer formation in the mollusc *Hyriopsis cumingii*[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2017, 2(3): 119-123.
- [20] Sudo S, Fujikawa T, Nagakura T, *et al.* Structures of mollusc shell framework proteins[J]. *Nature*, 1997, 387(6633): 563-564.
- [21] Mann S. Molecular recognition in biomineralization[J]. *Nature*, 1988, 332(10): 119-124.
- [22] Liu X J, Li J L, Xiang L, *et al.* The role of matrix proteins in the control of nacreous layer deposition during pearl formation[J]. *Proceedings: Biological Sciences*, 2012, 279(1730): 1000-1007.
- [23] 董绍建. 三角帆蚌贝壳基质蛋白基因silkmapin的生物矿化功能研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- Dong S J. Studies on biomineralization of shell matrix protein-silkmapin of *Hyriopsis cumingii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015(in Chinese).

A novel shell matrix protein *hic9* from *Hyriopsis cumingii* involved in the pearl biomineralization

LIU Xiaojun^{1,2,3}, GUO Wei¹, JIN Can¹, BAI Zhiyi¹, LI Jiale^{1,4*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

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

Abstract: In order to study more about the molecular mechanism of nacre formation, we cloned a novel shell matrix protein *hic9* (accession no. MF508725) from freshwater mussel *Hyriopsis cumingii*. We analyzed the gene expression by RT-PCR and in situ hybridization. The result indicated that *hic9* was expressed most highly in adductor muscle and mantle, and the strong signals occurred in the whole outer epithelial cells of outer fold, and also occurred in the crust groove between out fold and middle fold. This result indicated that *hic9* is a multifunctional matrix protein involved in the cuticle, prism layer and nacre layer of the shell. The amino acid sequence of *hic9* featured high proportion of Gly (14.81%)Pro (13.58%) and Ala (12.35%) residues, and formed the "Gly-X-X" structure in the middle of the sequence (X is any amino acid). And there is the continuous repetitive structure of alanine (polyA) structure close to the C terminal of the sequence, together giving the sequence of *hic9* similar characters of spider silk protein. The *Hic9* C terminus is composed of a hydrophobic sequence, "LAWMLFV", and this sequence is presumed to form a beta folding structure. Next to this sequence, the 89–91 bit is the "Asp-Leu-Asp" sequence, which is a typical Ca²⁺ binding site. In addition, the expression of *hic9* in primary pearl sac was detected by real-time quantitative PCR in the early stage of pearl formation. Expression levels of *hic9* in the pearl sac during 3–15 days after implantation maintained roughly the same, and the expression level of *hic9* had a significant increase during 18–25 days in the period of transition from irregular to orderly in calcium carbonate deposits, which indicates that *hic9* participates in this process and plays a key role in the formation of the macreous layer.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; biomineralization ; shell matrix protein; the nacreous layer; pearl

Corresponding author: LI Jiale. E-mail: jlli@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31272654); National Science and Technology Pillar Program (16DZ2281200); China Agriculture Research System(CARS-49)