

文章编号: 1000-0615(2019)12-2449-10

DOI: 10.11964/jfc.20181111542

## 三角帆蚌类丝状基质蛋白基因*silkmaxin*的克隆及其在贝壳和珍珠生物矿化中的作用

夏中慧<sup>1</sup>, 刘晓军<sup>1,2,3\*</sup>, 李家乐<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 上海海洋大学农业农村部淡水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)

**摘要:** 贝壳基质蛋白指导了珍珠形成过程中碳酸钙的成核、晶体生长和晶型选择等关键过程。为进一步研究珍珠形成的分子机理, 本实验使用RACE-PCR技术克隆得到一个新的贝壳基质蛋白基因, 并命名为*silkmaxin*。组织表达分析和原位杂交分析表明, 该蛋白于外套膜缘膜部外上表皮组织特异性表达, 证明*silkmaxin*基因所编码的蛋白属于珍珠层基质蛋白。*silkmaxin*基质蛋白氨基酸序列富含甘氨酸(Gly, 33.0%)和丝氨酸(Ser, 10.4%), 蛋白结构由 $\beta$ -折叠构成, 类似丝状蛋白结构。分析珍珠形成早期珍珠囊中该蛋白基因的表达发现, *silkmaxin*基因在珍珠囊内碳酸钙沉积物从无序到有序的转变过程中起了重要作用。通过RNA干扰实验可知, 贝壳基质蛋白是珍珠层文石小片正常生长不可缺少的因子, 当*silkmaxin*基因表达被抑制, 文石小片的成核、大小和形状均发生了改变。

**关键词:** 三角帆蚌; 生物矿化; 贝壳基质蛋白; 类丝状蛋白; 珍珠

**中图分类号:** Q 785; S 966.22<sup>†1</sup>

**文献标志码:** A

生物矿化在自然界中普遍存在, 包括脊椎动物的骨骼、硬骨鱼的牙齿以及一些动物的结石和鱼类的耳石等诸多生物体内外的特殊硬组织都属于生物矿化的产物。这些硬组织在生物体的生命活动中所起的作用非常广泛, 如脊椎动物骨骼可以对其结构起到支撑作用, 在软体动物中贝壳归属于外骨骼部分, 可以保护内部软体区域免受外界的伤害<sup>[1]</sup>。珍珠同样是一种生物矿化的产物, 其结构、成份与贝壳相近, 在自然界中的形成类似于结石, 二者形成机理均是由砂砾或者虫卵等异物侵入以后逐渐形成<sup>[2-3]</sup>。其组成成分包含95%的碳酸钙和少于5%的有机基质, 有机基质主要是由基质蛋白(matrix proteins)组成, 另外还包括少量的几丁质、糖和脂肪等<sup>[4]</sup>。上述几个基质蛋白也参与了矿化位点有机框架结构的构建, 以及碳酸钙晶体的成核、定向生长和晶型控制等过程, 上述几个过程在贝壳和

珍珠的矿化过程中起着关键的调控作用<sup>[5]</sup>。在淡水珍珠的人工生产过程中, 通过植入小片诱导珍珠贝类形成珍珠囊, 珍珠囊细胞再进一步分泌珍珠质形成珍珠<sup>[2]</sup>。Liu等<sup>[6]</sup>通过实时荧光定量PCR检测发现, 基质蛋白调控了珍珠囊分泌物由无序沉积向有序沉积转变的过程, 对珠核表面珍珠层的最终形成起到关键性作用。基质蛋白基因是珍珠形成过程中非常重要的一类功能基因, 对其进行分析研究对我国珍珠养殖生物技术的发展具有非常重要的意义。

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)是我国最重要的淡水产珠蚌, 其生产的淡水珍珠占我国珍珠总产量的90%以上。目前已经从三角帆蚌中分离和鉴定出若干个基质蛋白, 其中有Nacrein<sup>[7]</sup>、Hcperlucin<sup>[8]</sup>、HcCA<sup>[9]</sup>、Silkmapin<sup>[10]</sup>、Hic22<sup>[11]</sup>、Hic31<sup>[12]</sup>、Hic52<sup>[13]</sup>、Hic74<sup>[14]</sup>、HcTyr<sup>[15]</sup>、Hic24<sup>[16]</sup>和Hc-Upsalin<sup>[17]</sup>, 这些基质蛋白在贝壳的形成过

收稿日期: 2018-11-21 修回日期: 2019-03-30

资助项目: 国家自然科学基金(31672654); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-49); 国家科技支撑计划(2012BAD26B04)

通信作者: 刘晓军, E-mail: txliuxj@vip.163.com; 李家乐, E-mail: jlli2009@126.com

程中均起到了非常重要的作用。如Nacrein和HcCA作为碳酸酐酶,可将二氧化碳转化为碳酸氢根离子,为生物矿化过程提供了反应的原料;Silkmapin、Hic74、Hic31和Hic52都是贝壳微观结构框架蛋白;Silkmapin和Hic74属于典型的类丝状蛋白;而Hic31和Hic52都富含甘氨酸,且部分氨基酸序列具有与胶原蛋白类似的结构,这些蛋白质在体外可以构建有机框架,从而为进一步矿化提供了反应空间和成核位点;HcTyr作为酪氨酸酶,在一般生物体内与色素形成相关,而在三角帆蚌中则与贝壳珍珠层的颜色形成机理有关;Hic24是珍珠成核所必需的基质蛋白,当其在外套膜中的表达被有效抑制时,贝壳表面新沉积的碳酸钙晶体就不能在准确的位置发生成核过程,甚至导致出现无序沉积的现象<sup>[8-18]</sup>。

本实验从三角帆蚌cDNA文库中克隆和鉴定到一个新的基质蛋白基因*silkmaxin*,并且通过序列分析、半定量PCR、原位杂交、珍珠囊早期发育阶段表达量检测和RNA干扰(RNAi)等一系列实验来探究其在三角帆蚌生物矿化过程中的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品制备

实验材料为浙江省武义水产养殖有限公司养殖的1龄左右的20只三角帆蚌,于2017年3月25日运回实验室后放在河道中暂养5 d,从中随机选取10只健康个体,体长为(50.5~53.7) mm,体高为(24.75~27.83) mm,体宽为(10.08~11.38) mm,体质量为(9.34~12.69) g。提前配置好75%的酒精,将取组织需要的样钳、剪刀、研钵和研杵用无酶水清洗,用锡箔纸包好放入180 °C烘箱消毒6 h。分别取三角帆蚌边缘膜、中央膜、缘膜部、鳃、闭壳肌、斧足、血液、性腺、肝脏和肠等10个组织后立即放入装有RNAstore的离心管中置于冰上(放于4 °C冰箱保存),待组织全部取完之后放于-80 °C冰箱进行保存备用。采用TRIzol试剂(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA),根据说明书进行总RNA的提取,采用1.5%琼脂糖凝胶电泳法检测其完整性,用微量分光光度计(NanoDrop 2000 COD仪, Thermo Scientific, Wilmington, USA)检测其浓度和质量。以提取的总RNA为模板,按照SMARTer RACE cDNA Amplification Kit说明书进行反转录,得到

5'-RACE和3'-RACE cDNA模板。

### 1.2 cDNA全长克隆及序列分析

*silkmaxin*基因克隆使用的简并引物与克隆*Silkmapin*基因时所使用的简并引物相同<sup>[10]</sup>。通过RACE PCR得到*silkmaxin*的mRNA全长。经电泳检测合格后进行连接和转化,之后将所得菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。使用Sequencher软件对测序所得到的3'端和5'端序列进行拼接;通过Signal P 3.0软件对信号肽序列进行预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP.3.0/>);通过Phyre 2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>)预测氨基酸序列的二级结构;用SMART软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白的结构域;利用ExpAsy (<https://www.expasy.org/tools/>)预测蛋白分子量、等电点和氨基酸组分。

### 1.3 组织荧光定量分析

检测反转录后的cDNA产物浓度并分别稀释至50 µg/µL。利用NCBI数据库中的primer-blast软件设计*silkmaxin*基因的荧光定量引物*silkmaxin*-Q-F和*silkmaxin*-Q-R(表1)。EF1a为内参基因,其上下游引物分别为EF-a-F和EF-a-R(表1)。按说明书步骤分别依次加入SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus) (2×)10 µL, *silkmaxin*-Q-F 0.8 µL, *silkmaxin*-Q-R 0.8 µL, 模板2 µL, 最后用ddH<sub>2</sub>O将总体积补足至20 µL。每个组织的样品设置4个平行。反应程序:95 °C预变性3 min;95 °C变性5 s,60 °C退火20 s,40个循环;温度从60 °C上升至95 °C,之后绘制熔解曲线,从而判断扩增产物的准确性。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算目的基因的相对表达量,运用Origin 8.0软件绘制柱状图。

### 1.4 原位杂交

在设计荧光定量PCR引物之前添加T7,并于生工生物工程(上海)股份有限公司合成。将新鲜的三角帆蚌外套膜组织取出后迅速置于装有4%多聚甲醛的离心管固定6 h,用0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后转至20%的蔗糖溶液中,于4 °C冰箱放置约20 h,随后将其切片(玻片要提前经多聚赖氨酸处理,切片的厚度约为10 mm)。参照DIG nucleic acid detection kit (Roche, 瑞士)说明书进行原位杂交,最后用Detection buffer稀释的NBT/BCIP显色液避光显色3~16 h后在显微镜下观察并拍照。

表 1 实验中所用的引物

Tab. 1 The primers used in the experiment

引物名称 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
EF-a-F	GGAAGTCCCAGGCAGACTGTGC	qRT-PCR
EF-a-R	TCAAAACGGGCCGAGAGAAT	qRT-PCR
<i>silkmaxin</i> -Q-F	GGTCCCATCACCTCAGTGTC	qRT-PCR
<i>silkmaxin</i> -Q-R	TAGCCACCGAAGCCAAAAC	qRT-PCR
<i>silkmaxin</i> -YW-R	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGTAGCCACCGAAGCCAAAAC	ISH
<i>silkmaxin</i> -F1	TAGACCAACGTACGAAGAATAAGA	3'-RACE
<i>silkmaxin</i> -R1	ACGCCGTTACTTCAGAATTTTC	5'-RACE
<i>silkmaxin</i> -RNAi-F	AAGCAGTCATCATTTTATGTAGCA	qRT-PCR
<i>silkmaxin</i> -RNAi-R	TATGCCATCAAGATTGTAAGGA	qRT-PCR
<i>silkmaxin</i> -RNAi-T7-F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAAGCAGTCATCATTTTATGTAGCA	qRT-PCR
<i>silkmaxin</i> -RNAi-T7-R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTATGCCATCAAGATTGTAAGGA	qRT-PCR

## 1.5 珍珠囊RNA提取及定量

在同一批繁育的1龄左右、体长约50 mm、体高约27 mm、体宽约12 mm及体质量约12 g的健康三角帆蚌中随机挑选出32只, 将供片蚌和育珠蚌按1:1的比例进行分配并插片。供片蚌的色线去除后剪下3~4 cm<sup>2</sup>的外套膜边缘膜小片, 经消毒后方可插入到育珠蚌后端的外套膜中。分别在插片后的第3、5、8、11、15、18、22和30天从4个育珠蚌中进行珍珠囊组织取样, 将取出的珍珠囊组织迅速放入预冷的装有RNastore的离心管中, 在冰上进行低温处理, 等组织沉到离心管底端时立即放入-80 °C冰箱保存备用。将每个时间点的珍珠囊组织进行RNA提取并反转录为cDNA再进行荧光定量的检测, 荧光定量的引物分别为*silkmaxin*-Q-F和*silkmaxin*-Q-R。利用Origin 8.0绘制*silkmaxin*基因在不同时间点表达量变化的柱形图。

## 1.6 RNA干扰实验

利用Primer premier 5设计RNA干扰实验的引物, 在上下游引物前端分别加T7启动子(GCGTA-ATACGACTCACTATAGGG), 将割胶回收后的*silkmaxin*基因做为模板, 体外转录合成ds RNA。

具体方法: 5×Transcription buffer 25 μL, 25 mmol/L NTP mix 10 μL, 模板DNA 2.5 μg, RNase inhibitor 120 U, T7 RNA聚合酶80 U, 最后用DEPC水将总体积补充至125 μL, 混匀后放入PCR

仪中37 °C处理2 h; 反应完成后加10 U DNase I 37 °C处理15 min; 加270 μL的Rnase free水和450 μL的氯仿溶液混匀后4 °C、12 000 g离心2 min, 取上清液加入等体积的异戊醇溶液4 °C 12 000 g离心2 min, 弃上清液后再加入1/10的3 mol/L NaAc和2.5倍的无水乙醇(-20 °C), 静置30~60 min之后4 °C 12 000 g离心8~10 min, 弃上清液, 用70%的乙醇冲洗沉淀; 4 °C 7 500 g离心5 min, 干燥后加RNase free水溶解; 在PCR仪中分别进行70 °C(30 min)和37 °C(30 min)处理; 用电泳检测ds RNA的质量, 用超微量分光光度计检测ds RNA的浓度; 最后用DEPC水将ds RNA稀释到0.8 μg/L备用。

每组取6个1龄左右的三角帆蚌, 分别用于实验组、对照组和空白组。实验组每只三角帆蚌注射100 μL 0.8 μg/L *silkmaxin*-ds RNA, 对照组注射相同体积的PBS, 空白组不注射。7 d注射1次, 总共2次, 2周后在外套膜的边缘区和中央区对RNA抑制效果进行检测; 将取完组织的贝壳用超纯水冲洗干净后风干, 在贝壳珍珠层的边界和棱柱层切1 cm×1 cm的小块, 通过扫描电镜观察壳内表面晶体形态学特征。

## 2 结果

### 2.1 cDNA克隆及序列分析

通过拼接得到了全长为1 151 bp的*silkmaxin*基因的cDNA序列(图1), 其中*silkmaxin*基因的开

放阅读框(ORF)大小为885 bp。该序列共编码294个氨基酸,根据信号肽预测的结果发现,N端含有一个由15个氨基酸组成的信号肽。其理论等电点为9.52,分子量为28.39 ku,水源性平均值为0.001,属于亲水性基质蛋白。其氨基酸组成见表2,从表中不难看出,此氨基酸序列中甘氨酸(Gly)占整个序列氨基酸总数的33.0%,色氨酸(Ser)的含量占10.4%。

## 2.2 蛋白质结构预测

使用Phyre2对silkmaxin蛋白不包含信号肽的部分进行二级和高级结构的预测,表明了此基质蛋白的二级结构中主要是 $\beta$ -折叠结构,其占可预测结构的29%,但却不含有 $\alpha$ -螺旋结构,同时,此基质蛋白基因的高级结构类似于细丝状的结构(图2)。

## 2.3 组织荧光定量分析

半定量结果显示,silkmaxin基因在外套膜中表达(图3)。进一步通过荧光定量PCR检测该基因

在三角帆蚌的10个组织(边缘膜、缘膜部、中央膜、血液、性腺、肝脏、鳃、闭壳肌、斧足和肠)中的表达情况并进行分析,结果显示,silkmaxin基因特异表达于三角帆蚌的外套膜组织,其他组织表达量极低,可忽略(图4)。

## 2.4 silkmaxin基因的原位杂交检测

为进一步确定silkmaxin基因在外套膜中的具体表达位置,包括外褶、中褶、内褶,再进一步判断其在贝壳矿化中所起的作用,本实验通过原位杂交,利用地高辛标记的silkmaxin基因特异性探针在外套膜组织上进行原位杂交检测。结果显示,在外套膜的缘膜部上皮细胞中可以检测到较强的信号(图5)。

## 2.5 silkmaxin基因在珍珠囊形成和珍珠早期发育时期的荧光定量分析

使用qRT-PCR对silkmaxin基因在第3、5、8、11、15、18、22和30天等8个时间点上对三角帆蚌的珍珠囊进行表达分析检测。其结果显

```

1                                     GGGCTGCAGGATTTCGAATTCCTAGACCAACGTACGAAGAATAAGATCCCAAG
1  M K A V I I L C S I A L S T A T R W G Y
55  ATG AAA GCA GTC ATC ATT TTA TGT AGC ATC GCT TTG TCC ACA GCC ACA AGA TGG GGC TAT
21  S F G S S G F P Y G P G P W G G I G A G
116 AGT TTT GGT TCT AGT GGA TTT CCA TAT GGC CCT GGT CCC TGG GGT GGT ATT GGG GCT GGG
41  F G G F N H G G T T V V A G P T S I G F
176 TTC GGG GGA TTT AAT CAC GGT ACC ACT GTG GTT GCA GGA CCT ACA TCG ATT GGC TTC
61  G R G H S V S T P R G T V S T A V G K G
236 GGT CGC GGA CAT TCC GTC AGT ACT CCC AGG GGA ACA GTA TCA ACC GCT GTA GGT AAA GGC
81  I G T A P H N A G Q I V K V G P I T S V
296 ATC GGA ACA GCC CCT CAC AAT GCT GGT CAG ATA GTC AAG GTT GGT CCC ATC ACC TCA GTG
101 S S P L G S D H P T N G F F N G H G P Y
356 TCA AGC CCA CTT GGA TCT GAC CAC CCT ACT AAT GGC TTT TTT AAT GGT CAT GGT CCT TAC
121 N L D G I Y Y G Q G Y G L G P Y G G F
416 AAT CTT GAT GGC ATA TAT TAC GGC CAA GGA TAT GGA CTA GGC CCT TAT GGA GGT GGA TTT
141 G F G G G Y G L G G G Y R G Y S F F G F G
476 GGG TTT GGC GGT GGC TAC GGA TTT GGT GGT TAT CGA GGA TAT AGT TTT GGC TTC GGT
161 G Y G L G G G Y G L G G G Y G G Y S S G
536 GGC TAC GGG TTA GGT GGC GGC TAC GGA CTC GGT GGT TAT GGA GGA TAT AGT TCT GGT
181 F G G Y G P W G Y G I G A S R D V V G
595 TTT GGA GGA TAT GGA CCA TGG GGT GGA TAT GGC ATT GGA GCT AGC AGA GAT GTA GTA GGC
201 A G T S A A I S A R G N A E A N A V G S
656 GCT GGT ACC TCC GCA GCT ATC AGC GCT AGA GGA AAC GCT GAA GCT AAT GCT GTC GGT TCT
221 R V S G Q L I G V S S S G T G R P V W T
716 CGT GTT AGC GGA CAG CTC ATT GGG GTC AGC AGT TCT GGT ACA GGC AGA CCA GTG TGG ACA
241 P H G P I G V A D S G S S V T T G F G
776 CCA CAT GGC CCA ATT GGA GTA GCC GAT TCT GGC TCT AGC TCT GTC ACA ACC GGA TTT GGC
261 S F P Y G G Y S G G F G G I G F G G P
836 TCT TTC CCT TAT GGC GGA TAT AGC GGT GGT TTT GGC GGG GGA ATC GGT TTT GGA GGA CCT
281 L G G I G Y P S T K K F *
896 TTG GGC GGA ATT GGC GGT TAC TAT CCC TCT ACC AAG AAA TTC TGA AGTAACGGCGTAGATTTCGT
960 CAGTAACATAAACCATTTTGATATTGACTGCGTGCCTGGAAAATTGCTTTTCATCTATAATGCGAACATGTTTCATTCTAT
1 039 ATGACCACAGCCGTGCAGTACTGTCAAGCCTGGTACATAATTTCTGTTTCTCGCATGATTTAATCTGTTCAGATATT
1 118 ACAATTAATATCAGCTGGCATAATTCAAAAAA

```

图1 silkmaxin基因的mRNA序列及其编码的氨基酸序列

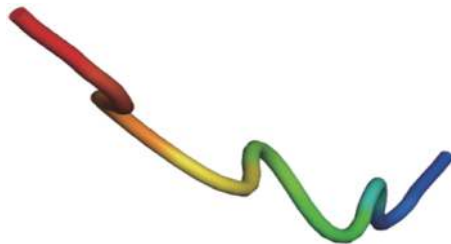
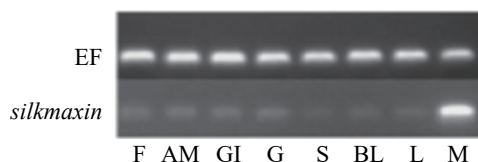
其用方框标出的部分为信号肽,灰色部分分别是起始子和终止子;该基因序列已提交到GenBank(登录号MK188932)

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of silkmaxin

The part marked by the box is the signal peptide, the grey parts are the initiator and the terminator; the cDNA sequence has been submitted to GenBank (Accession MK188932)

表 2 *silkmaxin* 蛋白的氨基酸组成

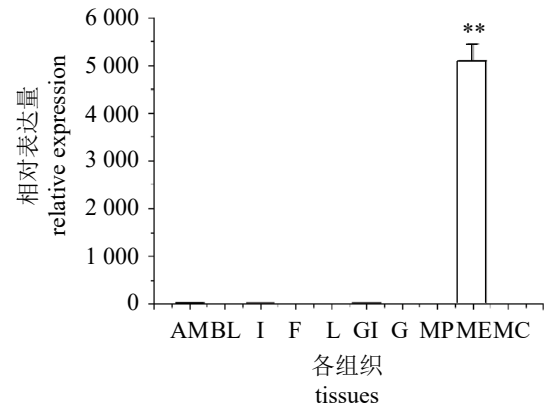
Tab. 2 Amino acid composition of <i>silkmaxin</i>			
氨基酸 amino acid	数量 number	氨基酸所占百分比/% percent of total amino acids	
甘氨酸 Gly (G)	92	33.00%	
丝氨酸 Ser (S)	29	10.40%	
酪氨酸 Tyr (Y)	20	7.20%	
脯氨酸 Pro (P)	18	6.50%	
苯丙氨酸 Phe (F)	17	6.10%	
苏氨酸 Thr (T)	16	5.70%	
缬氨酸 Val (V)	16	5.70%	
丙氨酸 Ala (A)	14	5.00%	
异亮氨酸 Ile (I)	12	4.30%	
亮氨酸 Leu (L)	8	2.90%	
精氨酸 Arg (R)	8	2.90%	
天门酰胺 Asn (N)	7	2.50%	
组氨酸 His (H)	6	2.20%	
赖氨酸 Lys (K)	4	1.40%	
色氨酸 Trp (W)	4	1.40%	
天门氨酸 Asp (D)	4	1.40%	
谷氨酰胺 Gln (Q)	3	1.10%	
谷氨酸 Glu (E)	1	0.40%	

图 2 *silkmaxin* 蛋白的二级结构及高级结构预测Fig. 2 Secondary structure and advanced structure prediction of *silkmaxin*图 3 *silkmaxin* 基因在各组织中的半定量检测

AM. 闭壳肌; BL. 血液; S. 肠; F. 斧足; L. 肝; M. 外套膜; GI. 鳃; G. 性腺; EF. 内参基因; 下同

Fig. 3 Tissue-specific test of *silkmaxin* by qRT-PCR

AM. adductor muscle; BL. blood; S. sausage; F. foot; M. mantle; GI. gill; G. gonad; EF. reference gene; the same below

图 4 荧光定量PCR检测 *silkmaxin* 基因在三角帆蚌各组织中的表达

MP. 缘膜部, ME. 边缘部, MC. 中央膜; \*\*. 差异性极显著 ( $P < 0.01$ )

Fig. 4 Tissue-specific expression of *silkmaxin* by qRT-PCR

MP. mantle pallial, ME. mantle edge, MC. mantle centre; \*\*. represent extremely significant difference ( $P < 0.01$ )

示, *silkmaxin* 基因的表达在第3天到第30天呈现先上升后下降的趋势, 第3~5天表达量处于平缓且极低的状态, 之后逐步上升, 到第11天表达量达到最高, 而后又开始下降(图6)。

## 2.6 *silkmaxin* 基因的RNA干扰实验及荧光定量分析

利用qRT-PCR检测干扰有效性。对比干扰前后发现, 实验组的表达量相对前两组降低了约40%, 而阴性对照组与阳性相对照其表达量无显著差异(图7)。

珍珠层以一种整洁而均匀的方式排列(图8-1, 3), 以层状的方式生长。同一层的文石大小基本一致, 具有成核位点。扫描电镜观察到的是成熟的棱柱层(图8-3, 4), 其表面平坦, 晶体与晶体之间是通过有机基质紧密相连在一起, 中间无缝隙, 板块之间的边界清晰可见, 可清楚地观察到其横截面晶体板块是呈多边形结构(图8)。

经过干扰以后的珍珠层, 同一层的文石小片形状不规则, 不再是常规的六边形, 同时大小不均匀。成核位点依然存在, 但失去了规律性, 无序的沉积物在表面出现, 可以证实, *silkmaxin* 基因在珍珠层形成过程中起着重要的作用。

## 3 讨论

本实验从外套膜cDNA中克隆得到一个新的

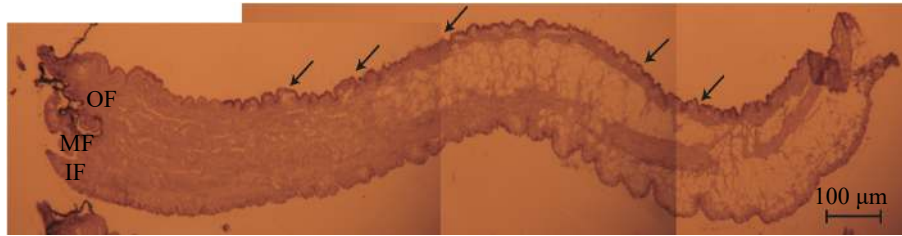


图5 *silkmaxin*在三角帆蚌外套膜中的原位杂交结果

OF. 外褶, MF. 中褶, IF. 内褶; 主要在外套膜边缘上皮细胞中表达黑箭头表示信号出现的地方

Fig. 5 *In situ* hybridization analysis of *silkmaxin* expression in the mantle of *H. cumingii*

IF. inner fold, MF. middle fold, OF. outer fold; mainly expressed in the mantle pallial; the black arrow indicates where the signal appears

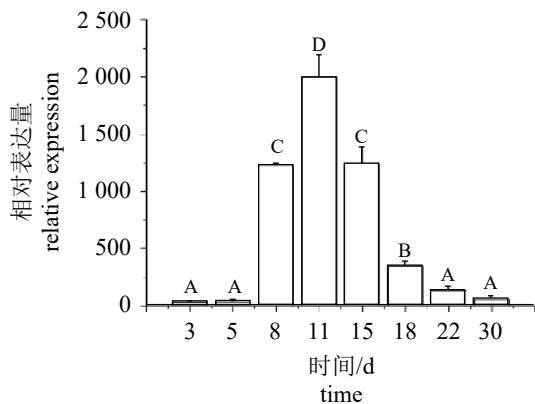


图6 珍珠囊形成早期*silkmaxin*基因在珍珠囊中的相对表达量

柱上方不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ ); 下同

Fig. 6 The relative expression level of *silkmaxin* in the pearl sac during the early stages after implantation of pearl formation

Different letters represent significant difference( $P < 0.05$ ); the same below

基质蛋白基因*silkmaxin*, 其编码的蛋白质中含有大量的甘氨酸和丝氨酸, 分别占整个氨基酸序列总数的33%和10.4%(表1), 符合贝壳基质蛋白的一般性特征, 即大多数的贝壳基质蛋白富含某种或某几种氨基酸<sup>[19]</sup>。*silkmaxin*基因在外套膜中有特异性表达, 外套膜的原位杂交结果显示, 其表达位置在外套膜的上皮细胞中, 推测该基因参与珍珠层的形成。由于富含甘氨酸和丝氨酸, 该蛋白的氨基酸组成具有明显的框架基质蛋白的特性, 这类蛋白质一般为非酸性基质蛋白, 主要参与矿化位点中有机框架的搭建<sup>[20]</sup>。其二级结构中含有大量的β-折叠结构, 其高级结构显示此蛋白为细丝状, 是一类类似于丝状蛋白的基质蛋白, 所以将其命名为*silkmaxin*。类丝状蛋白是一组一级结构具有模块化、重复性特

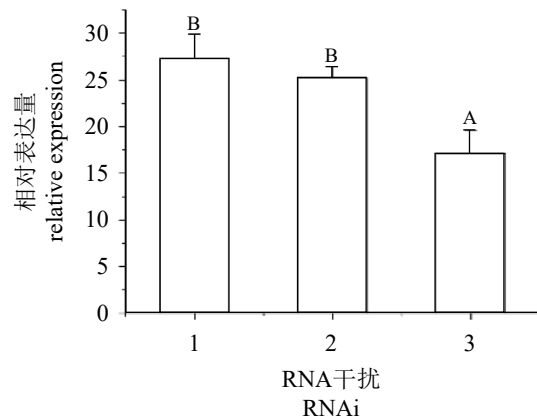


图7 *silkmaxin*通过RNA干扰实验在外套膜中的表达量分析

1. GFP-dsRNA, 2. PBS, 3. *silkmaxin*-dsRNA

Fig. 7 Expression level of *silkmaxin* in the mantle by RNAi treatment

1. GFP-dsRNA, 2. PBS, 3. *silkmaxin*-dsRNA

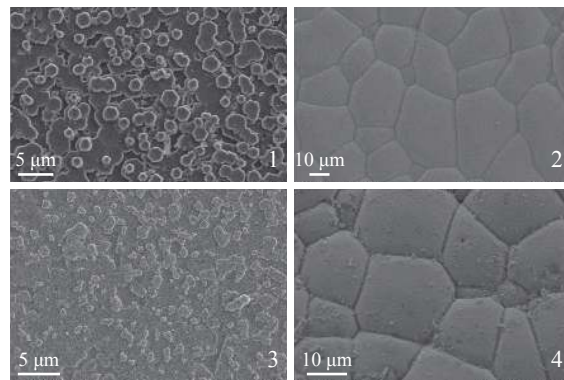


图8 对三角帆蚌表面的扫描电镜照片

1、2. 空白对照组;3、4. 实验组; 1、3. 珍珠层的超微结构; 2、4. 棱柱层的超微结构

Fig. 8 SEM images of the surface of the shell of the oysters

1, 2. control group; 3, 4. test group; 1, 3. ultrastructure of the pearl layer; 2, 4. ultrastructure of the prism layer

点的蛋白质, 其中重复性区域包括poly-A或poly-GA的分支、GPGXX/GPGQQ和类似于胶原蛋白的GGX(A=丙氨酸, G=甘氨酸, Q=谷氨酰胺, X=丙氨酸、丝氨酸、缬氨酸、酪氨酸或苏氨酸)<sup>[20-24]</sup>, 他们共同组成了一个由穿插在无定形区域的肽段所组成的模块化蛋白质<sup>[23, 25-26]</sup>。

贝壳有机基质在先前的研究中已经取得了不少成果, 通过分离和鉴定大量基质蛋白, 分析出了较多基质蛋白的序列结构特点, 并且已经获得了大量有关基质蛋白及对碳酸钙结晶影响的资料<sup>[5]</sup>。但相对于比较复杂的基质蛋白体系而言, 被鉴定出的还只是一小部分, 大量的基质蛋白还处于未开发状态。已有学者从软体动物外壳的有机基质中发现了一些类似丝状结构的蛋白质<sup>[10, 20, 27-28]</sup>, 同时在碳酸钙周围的有机基质中也有发现(可能以非晶态凝胶的形式出现)<sup>[29-31]</sup>。这些蛋白质包含了大量的甘氨酸或聚丙氨酸, 还有研究发现, 丝蛋白不仅可以诱导和调节CaCO<sub>3</sub>, 还对羟基磷灰石的矿化也产生作用<sup>[32-35]</sup>。

许多参与生物材料生产的蛋白质形态结构如细丝, 此特性主要由于在一部分蛋白质中含有大量的甘氨酸, *silkmaxin*中也含有大量的甘氨酸, 且二级结构显示该蛋白含有大量的β-折叠结构, 高级结构为细丝状, 因此, 推测其参与的贝壳矿化机理与其他多种类丝状的基质蛋白矿化机理相同。根据珍珠层的矿化分子机理模型显示<sup>[30]</sup>, 在珍珠质的矿化过程中, 单个文石小片的形成需要搭建矿化的场所, 即一个有机框架, 这个过程同时有其他框架蛋白参与, 这些类丝状蛋白呈无定形水合凝胶状态被大量的填充在几丁质框架的空间中。类蚕丝蛋白不仅是框架空间的填充物, 同时还是有机框架的组成部分, 在矿化形成的过程中起着至关重要的作用, 它们不仅可以抑制酸性成核位点以外的结晶, 而且在矿化后被紧紧地封闭于晶体片层之间, 最终成为有机框架的一部分<sup>[36]</sup>。外套膜分泌出的基质蛋白一旦进入外套腔的间液中, 其中的不可溶性的基质蛋白以及其他生物大分子组成的有机框架结构就会最先形成, 从而这些有机框架连同酸性基质蛋白就会为碳酸钙提供成核位点, 而钙离子和碳酸根离子在可溶性基质蛋白的作用下被有序地沉积到有机框架上并完成成核过程<sup>[36-37]</sup>。通过对外套膜中*silkmaxin*基因的RNA干扰表达检测, 发现壳层内表面的珍珠

层文石小片结晶过程发生明显变化, 说明此基质蛋白对贝壳珍珠层晶体的大小和形状有调控作用。实验组中珍珠层的超微结构在晶体层结构以及晶形、晶面和结晶排列等几个方面都出现了较大的变化: ①同一层文石小片形状不规则, 不再是规则的六边形, 且大小不一致; ②成核位点依然存在, 但失去原本的规律性; ③在表面出现了无序沉积物。

结合*silkmaxin*基因在珍珠囊中8个时间点的表达情况来分析*silkmaxin*蛋白在珍珠早期形成过程中的作用, 即该蛋白在无核珍珠生产过程中珍珠囊内沉积物从无到有过程中的作用。3~11 d为珍珠成核的初始阶段, 同时是无序沉积的阶段, *silkmaxin*基因的表达量总体呈逐渐升高趋势, 且在11 d时其表达量最高, 为珍珠囊继续分泌碳酸钙包裹小颗粒提供了基础。从11 d以后*silkmaxin*基因的表达量开始下降, 从11~18 d为珍珠囊内碳酸钙从无序沉积向有序沉积转变的过程, 属于珍珠层成核的前期, 此时期珍珠囊所分泌的碳酸钙出现了典型的成核现象, *silkmaxin*蛋白参与了此过程。到第25天时珍珠层已经初步形成, 且到了珍珠层的快速生长时期, 到第30天以后珍珠层进入了平稳生长时期。在这几个阶段, *silkmaxin*基因的表达量虽都偏低但仍有表达。经上述讨论和分析显示, *silkmaxin*蛋白参与了三角帆蚌珍珠形成的整个过程, 并在珍珠囊中的碳酸钙从无序沉积到有序沉积的转变发挥重要作用<sup>[6]</sup>。这也体现了类丝状蛋白的特性, 即类丝状蛋白填充进有机框架形成胶状物, 最后碳酸钙在其他蛋白的共同作用下被填充进去进而取代了胶状物物质<sup>[30]</sup>。事实上, 类丝状蛋白参与了有机框架的形成, 因此推测, *silkmaxin*蛋白正是在矿化的起始过程中发挥了作用, 珍珠囊通过大量分泌*silkmaxin*等有机框架蛋白来改变碳酸钙的沉积行为。

#### 参考文献:

- [1] Simkiss K, Wilbur K M. Biom mineralization. Cell biology and mineral deposition[M]. San Diego: Academic Press, 1989.
- [2] 李家乐, 白志毅, 刘晓军. 珍珠与珍珠文化[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2015.  
Li J L, Bai Z Y, Liu X J. Pearl and pearl culture[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2015(in Chinese).

- [3] 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).
- [4] Lowenstam H A, Weiner S. On biomineralization[M]. New York: Oxford University Press, 1989.
- [5] Zhang C, Zhang R Q. Matrix proteins in the outer shells of molluscs[J]. *Marine Biotechnology*, 2006, 8(6): 572-586.
- [6] 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 of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2012, 279(1730): 1000-1007.
- [7] 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).
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Chen X J, Liu X J, Bai Z Y, *et al.* *HcTyr* and *HcTyp-1* of *Hyriopsis cumingii*, novel tyrosinase and tyrosinase-related protein genes involved in nacre color formation[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B-Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 204: 1-8.
- [16] Liu X J, Liu Z M, Jin C, *et al.* A novel nacre matrix protein hic24 in *Hyriopsis cumingii* is essential for calcium carbonate nucleation and involved in pearl formation[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2019, 66(1): 14-20.
- [17] Liu X J, Jin C, Guo W, *et al.* Identification and molecular characterization of hc-upsalin, a novel matrix protein involved in nacreous-layer biomineralization in *Hyriopsis cumingii*[J]. *Thalassas: An International Journal of Marine Sciences*, 2019, 35(1): 143-150.
- [18] Revay T, Bodzsar N, Mobegi V E, *et al.* Origin of Hungarian indigenous chicken breeds inferred from mitochondrial DNA D-loop sequences[J]. *Animal Genetics*, 2010, 41(5): 548-550.
- [19] 刘晓军, 李家乐. 养殖珍珠贝壳基质蛋白研究进展[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(2): 200-205.  
Liu X J, Li J L. Matrix proteins in the shell of cultured pearl bivalves[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(2): 200-205(in Chinese).
- [20] Sudo S, Fujikawa T, Nagakura T, *et al.* Structures of mollusc shell framework proteins[J]. *Nature*, 1997, 387(6633): 563-564.
- [21] Hayashi C Y, Shipley N H, Lewis R V. Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999, 24(2-3): 271-275.
- [22] Ayoub N A, Garb J E, Tinghitella R M, *et al.* Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes[J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): e514.
- [23] Gage L P, Manning R F. Internal structure of the silk fibroin gene of *Bombyx mori*. I the fibroin gene consists



- of a homogeneous alternating array of repetitious crystalline and amorphous coding sequences[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1980, 255(19): 9444-9450.
- [24] Zhou C Z, Confalonieri F, Medina N, *et al.* Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): 2413-2419.
- [25] Xu M, Lewis R V. Structure of a protein superfiber: spider dragline silk[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(18): 7120-7124.
- [26] Simmons A, Ray E, Jelinski L W. Solid-state <sup>13</sup>C NMR of *Nephila clavipes* dragline silk establishes structure and identity of crystalline regions[J]. *Macromolecules*, 1994, 27(18): 5235-5237.
- [27] Yano M, Nagai K, Morimoto K, *et al.* Shematrin: a family of glycine-rich structural proteins in the shell of the pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B- Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 144(2): 254-262.
- [28] Takahashi J, Takagi M, Okihana Y, *et al.* A novel silk-like shell matrix gene is expressed in the mantle edge of the Pacific oyster prior to shell regeneration[J]. *Gene*, 2012, 499(1): 130-134.
- [29] 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.
- [30] Pereira-Mouriès L, Almeida M J, Ribeiro C, *et al.* Soluble silk-like organic matrix in the nacreous layer of the bivalve *Pinctada maxima*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(20): 4994-5003.
- [31] Nudelman F, Shimoni E, Klein E, *et al.* Forming nacreous layer of the shells of the bivalves *Atrina rigida* and *Pinctada margaritifera*: an environmental- and cryo-scanning electron microscopy study[J]. *Journal of Structural Biology*, 2008, 162(2): 290-300.
- [32] Huang X W, Liu X, Liu S S, *et al.* Biomineralization regulation by nano-sized features in silk fibroin proteins: synthesis of water-dispersible nano-hydroxyapatite[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2014, 102(8): 1720-1729.
- [33] Marelli B, Ghezzi C E, Alessandrino A, *et al.* Silk fibroin derived polypeptide-induced biomineralization of collagen[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(1): 102-108.
- [34] Cheng C, Shao Z Z, Vollrath F. Silk fibroin - regulated crystallization of calcium carbonate[J]. *Advanced Functional Materials*, 2008, 18(15): 2172-2179.
- [35] Kong X D, Cui F Z, Wang X M, *et al.* Silk fibroin regulated mineralization of hydroxyapatite nanocrystals[J]. *Journal of Crystal Growth*, 2004, 270(1-2): 197-202.
- [36] Addadi L, Moradian J, Shay E, *et al.* A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation: relevance to biomineralization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84(9): 2732-2736.
- [37] McDougall C, Woodcroft B J, Degnan B M. The widespread prevalence and functional significance of silk-like structural proteins in metazoan biological materials[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159128.

## The role of *Hyriopsis cumingii* shell silk-like matrix protein gene *silkmaxin* in the shell and pearl biosmineralization

XIA Zhonghui<sup>1</sup>, LIU Xiaojun<sup>1,2,3\*</sup>, LI Jiale<sup>1,2,3\*</sup>

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

**Abstract:** Shell matrix proteins control the nucleation, size and crystal phase of calcium carbonate during the biomineralization of pearl, and they are related to pearl quality. In order to study more about the molecular mechanism of nacre formation, we cloned a novel shell matrix protein *silkmaxin* (accession No. MK188932) from freshwater mussel *Hyriopsis cumingii*. With the gene expression detected by RT-PCR and in situ hybridization, *silkmaxin* was specially expressed in the pallial epithelial cells of mantle outer fold, which indicated that *silkmaxin* is a nacreous layer matrix protein. The amino acid sequence of *silkmaxin* featured high proportion of Gly (33.0%) and Ser (10.4%) residues, and the second structure is mainly composed of  $\beta$ -folds. The high structure prediction indicated that *silkmaxin* is a silk-like protein. In addition, the expression of *silkmaxin* was detected in the early stage of pearl formation by real-time quantitative PCR. The results indicated that *silkmaxin* played important roles in the transition of the calcium carbonate disordered deposition to ordered deposition in the early stage of pearl formation. The study of shell by *silkmaxin* RNAi treatment indicates that *silkmaxin* gene is essential for the correct growth of aragonite tablets, including the size and shape of the newly formed calcium carbonate crystals.

**Key words:** *Hyriopsis cumingii*; biomineralization; shell matrix proteins; silk-like proteins; pearl

**Corresponding author:** LIU Xiaojun. E-mail: txliuxj@vip.163.com; LI Jiale. E-mail: jlli2009@126.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31672654); Modern Agro-industry Technology; Research System (CARS-49); National Science and Technology Support Plan (2012BAD26B04) in Finance