

三角帆蚌基质蛋白基因 *cysrichin-F* 序列与功能分析

梁晨晨¹, 刘晓军², 汪桂玲¹

(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. 浙江清华长三角研究院 生物技术与医药研究所, 浙江 嘉兴 314000)

摘要: 基质蛋白在调控无机矿物质形成过程中起着至关重要的作用, 为了探究三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 基质蛋白对贝壳生物矿化的影响, 从三角帆蚌中分离获得一个新的基质蛋白基因 *cysrichin-F*, 并进一步利用原位杂交、破壳修复、RNA 干扰等技术探究了该基因的生物学功能。结果显示, *cysrichin-F* 序列全长为 592 bp, 开放阅读框区域 (Open reading frame, ORF) 为 42~389 bp, 共编码 115 个氨基酸。该基因编码的蛋白理论分子量为 12.895 ku, 理论等电点为 8.65, 为碱性蛋白, 半胱氨酸富集-F (CYSRICHIN-F) 的前 23 个氨基酸为信号肽。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测发现, 该基因在外套膜中的表达量相对其他组织更高。进一步通过原位杂交和破壳修复技术发现, *cysrichin-F* 参与了贝壳角质层和棱柱层的形成过程, 该基因被干扰后, 贝壳棱柱层的结构将被破坏, 最终导致贝壳棱柱层形状不规则。研究表明, *cysrichin-F* 参与了贝壳角质层和棱柱层的生物矿化过程, 研究结果有助于阐明三角帆蚌生物矿化的分子机制, 为三角帆蚌基质蛋白在贝壳形成过程中发挥的作用提供一定的理论基础。

关键词: 三角帆蚌; 基质蛋白; 原位杂交; 破壳修复; RNA 干扰

中图分类号: S 917

文献标志码: A

生物矿化 (Biom mineralization) 是由生物体诱导矿物质沉淀, 从而产生骨骼、牙齿、耳石和外壳等硬组织的过程^[1]。软体动物壳的形成是涉及到生物矿化和有机物质沉积的复杂过程, 通过这一复杂的过程形成由碳酸钙矿物质 (如方解石或钙质) 和有机基质 (如蛋白质、多糖等) 组成的多级有序结构的有机-无机复合结构^[2]。贝壳的生物矿化不仅涉及到材料的合成, 还涉及到生物体的调控。例如, 三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 的贝壳基质蛋白在碳酸钙沉积、贝壳有机框架的构建等生物矿化过程中扮演着关键角色^[3-4]。

基质蛋白由外套膜分泌并引导外壳形成, 可以调节晶体成核、形态、取向和生长。晶体成核蛋白和框架蛋白共同调控着贝壳的形成^[5]。框架蛋白包括丝状蛋白、几丁质结合蛋白、几丁质相关酶、细胞外基质相关蛋白和富含半胱氨酸 (Cys) 的蛋白^[6]。这些蛋白质通过特定的结构域

和相互作用网络形成复杂的纤维网络, 如纤维连接蛋白 (Fibronectin, FN)、层粘连蛋白 (Laminin, LAM)、胶原蛋白 (Collagen, COL) 和弹性蛋白 (Elastin, ELAS) 等^[7]。最常见的框架蛋白是丝状蛋白, 是富含甘氨酸 (Gly) 和丙氨酸 (Ala) 的不溶性蛋白, 其具有反平行 β 折叠片结构以及与丝纤维相似的结构和组成, 位于几丁质的上下表面^[8]。类丝状蛋白具有一些特殊的模块化结构: shematrin 家族^[9]中 shematrin 1-7 都含有 XGnX 的重复结构域 (X 为疏水性氨基酸), 是与棱柱层形成有关的类鞭毛丝蛋白; 参与棱柱层形成的鞭毛丝状蛋白 silkmapi^[10] 富含甘氨酸与丙氨酸残基, 与 shematrin 家族相似。

三角帆蚌是中国的主要淡水育珠蚌^[11], 其基质蛋白在调控无机矿物质形成过程中起着至关重要的作用。研究结果表明, 三角帆蚌珍珠层中框架蛋白的含量极其丰富^[12]。但目前关于棱柱

收稿日期: 2024-09-28 修回日期: 2024-11-07

基金项目: 国家自然科学基金 (32072975)

作者简介: 梁晨晨 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与种苗工程。E-mail: 411002015@qq.com

通信作者: 汪桂玲, E-mail: glwang@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

层框架基质蛋白的研究却鲜有报道,为了进一步探究贝壳形成的分子机制,从三角帆蚌外套膜中克隆获得了1个新的贝壳基质蛋白基因 *cysrichin-F*,并且对该基质蛋白的氨基酸组成进行了分析。通过实时荧光定量PCR与原位杂交技术分析了该基因在外套膜中的表达情况,进一步通过破壳修复和RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术探究该基因对贝壳生长的影响,研究结果有助于深入理解三角帆蚌基质蛋白在贝壳形成过程中发挥的功能与作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验使用的三角帆蚌在浙江清华长三角研究院暂养。蚌龄为1.5年,选用的三角帆蚌均健壮,壳长(7.5±0.2)cm,质量60~65 g。从7只三角帆蚌中采集它们的不同组织样本,进行组织定量试验。破壳修复试验选取100只三角帆蚌,其中50只进行破壳处理,50只作为对照。干扰试验选取20只三角帆蚌,10只作为试验组,另外10只作为对照组。剪取的组织存放于

RNAlater™ Soln (Thermo Fisher Scientific) 中, -80 °C保存。试验获得了上海海洋大学实验动物伦理委员会的批准(SHOU-DW-2021-027)。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA提取与反转录

RNA的提取需要在无酶的环境中,因此在试验前需将所有试验用品进行无菌无酶处理。用于RNA提取的组织需先放入1 mL RNAlater 溶液中-80 °C保存。通过Trizol (Thermo Fisher) 法提取RNA,使用试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 进行反转录。

1.2.2 三角帆蚌 *cysrichin-F* 基因全长的获取

cysrichin-F 序列依据 MSI7 基因序列的“KYGG”设计简并引物 *cysrichin-F-F*, 5'-AARTAYGGNGGN-3', R=A/G, Y=T/C, N=A/T/G/C, 进行3'RACE。进一步根据3'RACE产物来设计5'RACE的特异性引物 *cysrichin-F-R* (表1)。将两次的结果进行拼接获得 *cysrichin-F* 基因的全长序列。

表1 三角帆蚌 *cysrichin-F* 基因引物设计
Tab. 1 Primer design for *cysrichin-F* gene in *H. cumingii*

引物名称 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	用途 Application
<i>cysrichin-F-F</i>	AARTAYGGNGGN	3'RACE
<i>cysrichin-F-R</i>	ATCCGATACGTCACCTACACTG	5'RACE
<i>cysrichin-F-RT-F</i>	ATGTCTGGAACCTGCCTACGG	qRT-PCR
<i>cysrichin-F-RT-R</i>	TTACGCACGCCACATGCTGTA	qRT-PCR
<i>EF-1α-F</i>	GGAACCTCCAGGCAGACTGTGC	内参基因
<i>EF-1α-R</i>	TCAAAACGGGCCGAGAGAAT	内参基因
<i>cysrichin-F-RNAi-F+T7</i>	TAATACGACTCACTATAGGGGAGTTTACTTCCGGCATCCAA	RNAi
<i>cysrichin-F-RNAi-R</i>	CTACAGTTACGCACGCCACAT	RNAi
<i>cysrichin-F-RNAi-F</i>	GAGTTTACTTCCGGCATCCAA	RNAi
<i>cysrichin-F-RNAi-R+T7</i>	TAATACGACTCACTATAGGGCTACAGTTACGCACGCCACAT	RNAi

1.2.3 生物信息学分析

使用NCBI的BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对 *cysrichin-F* 进行核苷酸与氨基酸序列相似性比对。使用ORF finder (www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder) 对 *cysrichin-F* 开放阅读框进行预测。使用SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php/SignalP-5.0>) 对信号肽进行预测。使用ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对蛋白性质进行测定。使

用Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi%3fid%3dindex>) 对蛋白二级结构进行预测。

1.2.4 三角帆蚌 *cysrichin-F* 基因的组织表达与原位杂交

基因 *cysrichin-F* 的引物为 *cysrichin-F-RT-F* / *cysrichin-F-RT-R*, 上述引物见表1。各组织的荧光定量PCR使用试剂盒2×SYBR Green PCR Master mix (Solarbio) 进行, 各组织样品设置3个

重复。反应体系为 25 μ L:模板 cDNA 5 μ L,上下引物各 1.5 μ L,4.5 μ L 的 ddH₂O,12.5 μ L 的 2 \times SYBR Green PCR Master mix,反应程序 95 $^{\circ}$ C,10 min;95 $^{\circ}$ C,15 s;55 $^{\circ}$ C,30 s;72 $^{\circ}$ C,30 s;40 个循环。基因 *cysrichin-F* 的原位杂交试验由科学指南针科研服务平台完成,探针序列为 CACCATACTTTGAGCACCATCCC。

1.2.5 三角帆蚌 *cysrichin-F* 基因的破壳修复

选取健康的三角帆蚌在壳边缘的出水口位置剪 1 个 V 形切口,破壳后正常养殖。在第 1 天、第 6 天、第 14 天、第 18 天、第 21 天、第 29 天、第 33 天和第 39 天取破壳位置的外套膜组织,同时采集未破壳的三角帆蚌外套膜组织作为对照。使用荧光定量 PCR 仪(CFX96 touch, Bio-Rad)检测数据,通过数据分析基因 *cysrichin-F* 在各时期的表达情况。

1.2.6 RNAi 功能验证

选取 20 只三角帆蚌分为两组:一组作为阴性对照组注射 GFP-dsRNA,另一组作为试验组注射 *cysrichin-F*-dsRNA。基因 *cysrichin-F* 的干扰链通过引物 *cysrichin-F*-RNAi-F+T7、*cysrichin-F*-RNAi-R 和 *cysrichin-F*-RNAi-F、*cysrichin-F*-RNAi-R+T7 分别合成靶序列 cDNA(表 1)。

使用 T7 High Efficiency Transcription Kit

(Solarbio)将合成的靶序列 cDNA 转录为 ssRNA 后等量混合 70 $^{\circ}$ C 反应 10 min 合成 *cysrichin-F*-dsRNA,纯化合成的 *cysrichin-F*-dsRNA。

阴性对照注射 GFP-dsRNA 100 μ L,试验组注射合成的 dsRNA 100 μ L,注射位置都为出水口侧闭壳肌。7 d 后对三角帆蚌外套膜进行取样提取 RNA 并反转录 cDNA。以 cDNA 为模板进行荧光定量检测分析 RNAi 的效果。取 0.5 cm \times 1.0 cm 的边缘贝壳,使用电子扫描显微镜(Scanning electron microscope, SEM)(S-4800, Hitachi)观察贝壳微观结构,分析 RNAi 的效果。

2 结果

2.1 三角帆蚌 *cysrichin-F* 基因全长分析

cysrichin-F 序列全长为 592 bp,开放阅读框区域在 42~389 bp 位置,长 348 bp,共编码 115 个氨基酸,第 42 个核苷酸 ATG 为 *cysrichin-F* 基因的起始密码子。*cysrichin-F* 理论分子量为 12.895 ku,等电点为 8.65(表 2)。CYSRICHIN-F 的 1-23 氨基酸序列为信号肽(图 1),是一个碱性蛋白。CYSRICHIN-F 蛋白的亲疏水性交替出现,在二级结构分析中 α 螺旋结构占比 11%, β 折叠区域占比 23%(图 2)。该基因的氨基酸组成中 Cys 和 Gly 的含量都超过了 10%。

1	GGGTACCGGGCCCCCTCGAGTTTACTTCCGGCATCCAAGATGAAGGGAAGTTTTGTTT
1	<u>M K G S F V</u>
61	CATTGTTTTTGCTATGTTTAGCAGCAACATGTCTGGAACCTGCCTACGGCATTTCATT
7	<u>S L F L L C L A A T C L E P A Y G I F N</u>
121	TTCTTGCCCTATGGGATGTATGGATACACGGTGTACTTTGAGTATGGGATGTCCCTGG
27	<u>F P C P M G C M D T R C T L S M G C P L</u>
181	GCAGGTGCATGCCGGGATGGTGCTCAAAGTATGGTGGAAGGAACGTGGGAATGTTTTGTC
47	<u>G R C M P G W C S K Y G G R N V G M F C</u>
241	TTCCCAGCTGTCCGGCGGGGAGTACTGTTACCAAGGAATTGCCAATATGTGTACAGCAT
67	<u>L P S C P A G E Y C Y Q G I A N M C T A</u>
301	GTGGCGTGCGTAACTGTAGTCGCTGCAGCGATCGGTACACATGTGATGCCTGTAAGAGGG
87	<u>C G V R N C S R C S D R Y T C D A C K R</u>
361	GTTATACATTAAGCTCTGACAAACGTCAGTGTAGGTGACGTATCGGATAGAGTCAATACT
107	<u>G Y T L S S D K R Q C R *</u>
421	TCAAGATATGACAAATGGAGATATAAAAGTGCTACTGCTATCAAGCAAATGAAATTGATTT
481	CAAAATGTAGAGTATGTTACTTGCAACTCTACTCAGAACTGTTTTGTTGGACACGCAAAT
541	AAAAAATGATGTTTTGCAAATAAACTTTTAATTGATAAAAAAAAAAAAAA

下划线部分为预测的信号肽。cDNA 序列已提交至 GenBank (PQ373857) 中。

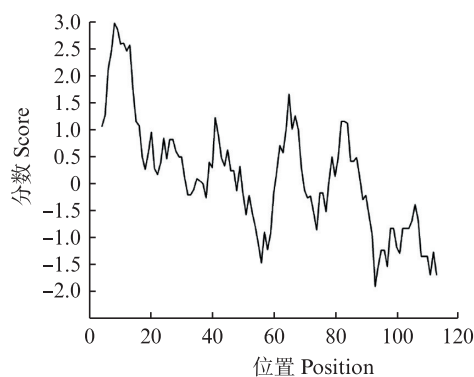
The underlined sections are the predicted signal peptides. The cDNA sequence has been deposited in GenBank (PQ373857).

图 1 三角帆蚌 *cysrichin-F* 基因的核苷酸与氨基酸序列

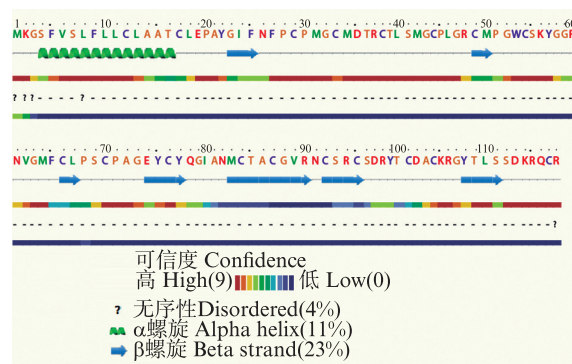
Fig. 1 Nucleotide and amino acid sequence of *cysrichin-F* in *H. cumingii*

表2 CYSRICHIN-F的氨基酸组成
Tab. 2 Amino acid composition of the CYSRICHIN-F

氨基酸 Amino acid	百分比 Percent/%	氨基酸 Amino acid	百分比 Percent/%
半胱氨酸 Cysteine	15.3	天冬酰胺 Asparagine	3.4
甘氨酸 Glycine	11.0	天冬氨酸 Aspartate	3.4
精氨酸 Arginine	7.6	赖氨酸 Lysine	3.4
亮氨酸 Leucine	7.6	谷氨酰胺 Glutamine	1.7
丝氨酸 Serine	7.6	谷氨酸 Glutamate	1.7
丙氨酸 Alanine	5.9	异亮氨酸 Isoleucine	1.7
蛋氨酸 Methionine	5.9	缬氨酸 Valine	2.5
脯氨酸 Proline	5.9	色氨酸 Tryptophan	0.8
苏氨酸 Threonine	5.1	组氨酸 Histidine	0
酪氨酸 Tyrosine	5.1	吡咯赖氨酸 Pyrrolysine	0
苯丙氨酸 Phenylalanine	4.2	硒半胱氨酸 Selenocysteine	0



(a) 蛋白CYSRICHIN-F的疏水性分析
Hydrophobic analysis of protein CYSRICHIN-F



(b) 蛋白CYSRICHIN-F的二级结构分析
Secondary structure analysis of protein CYSRICHIN-F

图2 CYSRICHIN-F的性质分析
Fig. 2 Property analysis of the CYSRICHIN-F

2.2 三角帆蚌 *cysrichin-F* 基因组织表达分析

三角帆蚌各组织的半定量结果显示, *cysrichin-F* 基因在各组织中均有表达。各组织的荧光定量分析结果与半定量一致, 在检测的所有三角帆蚌组织中均有表达, 但在外套膜中的表达量比其他组织高(图3)。

2.3 三角帆蚌 *cysrichin-F* 基因的原位杂交定位

原位杂交实验中 *cysrichin-F* 在外套膜中的表达情况如图4所示, 其在边缘膜外上皮细胞和边缘膜中褶的外上皮细胞显示信号, 说明基质蛋白 CYSRICHIN-F 由此分泌。

2.4 三角帆蚌 *cysrichin-F* 基因在贝壳修复中的作用

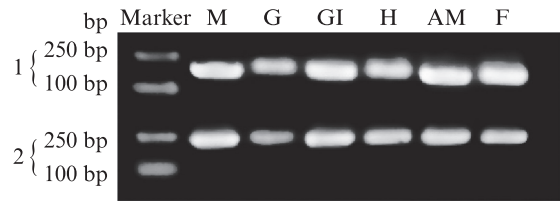
本研究进行了为期39 d的破壳修复实验, 在相应的天数剪取实验组与对照组的外套膜组织。在实验开始的第1天, 实验组与对照组的表

达情况为实验组 *cysrichin-F* 表达水平与对照组没有显著差异, 而在第6天时实验组基因表达水平高于对照组。之后的荧光表达数据分析中, 实验组数据都高于对照组。实验组在第18天时出现了1个表达量高点, 在21天时降低。从21~33天表达量又逐渐上升(图5)。破壳修复的荧光定量数据证明基质蛋白 CYSRICHIN-F 确实参与了壳的修复过程。

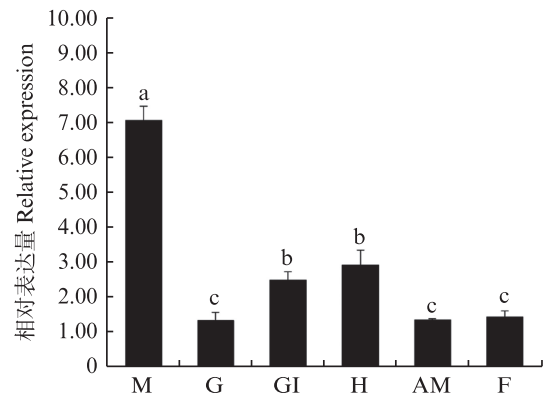
2.5 三角帆蚌 *cysrichin-F* 基因的干扰分析

注射 *cysrichin-F*-dsRNA 的实验组与注射 GFP-dsRNA 的对照组相比, 实验组的 *cysrichin-F* 干扰率约为70% ($P < 0.01$), 见图6。对贝壳的表面进行SEM观察, 棱柱层的观察结果显示对照组的棱柱层结构清晰, 形状正常, 实验组中棱柱层的结构被破坏, 形状变得不规则, 碳酸钙无序沉积没有正常进行(图版I)。干扰后的珍珠层在

电镜下实验组与对照组相比变化不明显(图版 II)。注射 *cysrichin-F*-dsRNA 后对三角帆蚌的棱柱层影响很大,说明 *cysrichin-F* 基因主要影响棱柱层的形成。



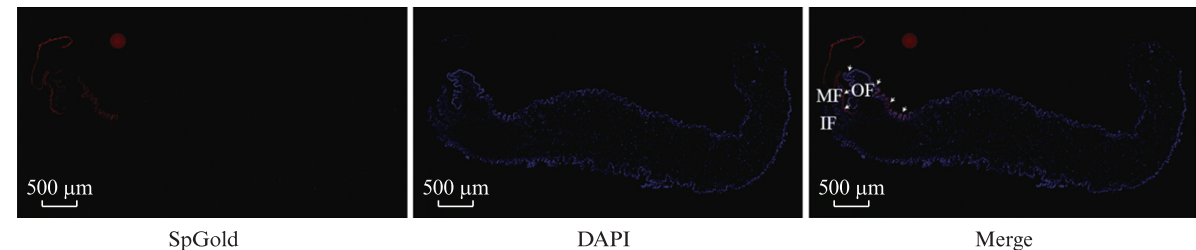
(a) *Cysrichin-F*在各组织中的半定量分析
Semi-quantitative analysis of *cysrichin-F* in each tissue



(b) *Cysrichin-F*在各组织中的荧光定量分析
Quantitative fluorescence analysis of *cysrichin-F* in each tissue

1. *cysrichin-F* 基因在各组织中的表达;2. 内参 EF 基因在各组织中的表达。不同小写字母(a,b,c,d)表示各组织之间存在显著性差异($P<0.05$)。G. 性腺;AM. 闭壳肌;M. 外套膜;GI. 鳃;F. 斧足;H. 肝胰腺。
1 shows the expression of the *cysrichin-F* gene in each tissue; 2 shows the expression of the reference EF gene in each tissue. Different lowercase letters (a, b, c, d) indicate significant differences between tissues ($P<0.05$). G. Gonad; AM. Adductor muscle; M. Mantle; GI. Gill; F. Foot; H. Hepatopaneas.

图3 三角帆蚌 *cysrichin-F* 基因在各组织中的表达量分析
Fig. 3 Expression level analysis of *cysrichin-F* gene in 6 tissues in *H. cumingii*



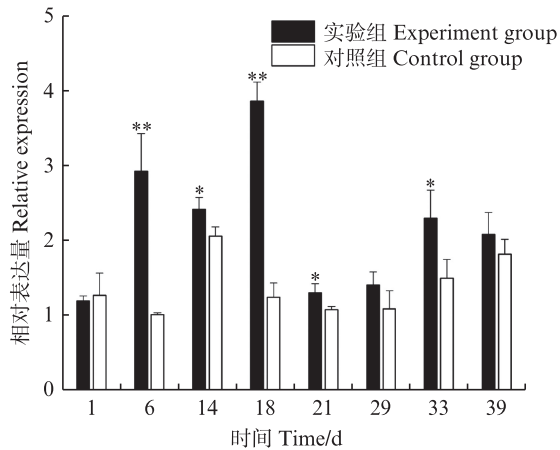
IF. 内褶;MF. 中褶;OF. 外褶。箭头所指为信号区域。
IF. Inner fold; MF. Middle fold; OF. Outer fold. Signal areas are indicated by arrows.

图4 三角帆蚌 *cysrichin-F* 基因的原位杂交
Fig. 4 In situ hybridization of *cysrichin-F* in *H. cumingii*

3 讨论

壳类生物矿化是生物大分子调节碳酸钙晶体沉积的过程。先前的研究已经证实,酸性基质蛋白由于其优异的钙结合能力,在晶体成核、生长和晶型调控中起主导作用^[13]。此外,已经分离

出少量碱性基质蛋白,并且已知它们参与框架结构和促进或抑制晶体生长^[14]。因此,进一步了解碱性基质蛋白可以拓宽生物矿化的研究。同时,相比于珍珠层三角帆蚌棱柱层基质蛋白的研究还比较少。本研究从三角帆蚌中分离鉴定了1个新的棱柱层框架基质蛋白基因 *cysrichin-F*。

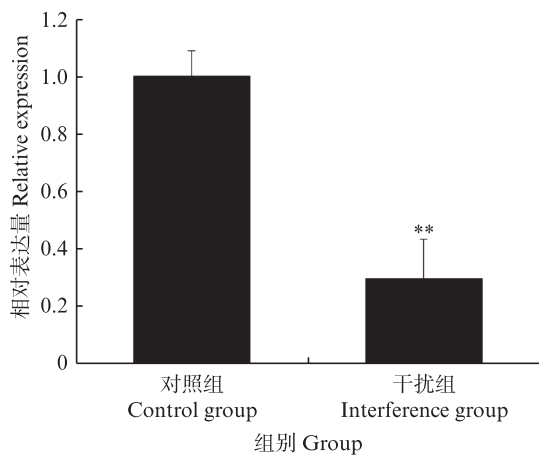


实验组与对照组相比*表示差异显著 $P < 0.05$, **表示差异极显著 $P < 0.01$ 。

Compared with the control group, * indicated a significant difference $P < 0.05$, ** indicated a high significant difference $P < 0.01$.

图5 三角帆蚌 *cysrichin-F* 基因壳修复 0~39 d 的表达量分析

Fig. 5 Expression of *cysrichin-F* gene on days 0-39 of shell restoration in *H. cumingii*



** 表示干扰组与对照组相比差异极显著 $P < 0.01$ 。

** indicates a high significant difference between the interference group and the control group, $P < 0.01$.

图6 三角帆蚌注射 dsRNA-*cysrichin-F* 后基因表达量的变化

Fig. 6 Changes in gene expression levels after dsRNA-*cysrichin-F* injection in *H. cumingii*

CYSRICHIN-F 的氨基酸组成中含有高比例的 Cys 和 Gly。高比例的 Cys 残基可能与二硫键的形成有关。可能含有二硫键的 Prsilkin-39 是与棱柱层有机框架形成密切相关的基质蛋白,二硫键通过两个 Cys 残基的巯基 (-SH) 氧化形成的 S-S 共价键,对于蛋白质的三维结构的稳定性至关重要^[15]。它们可以存在于分子内,连接同一多肽链中的不同部分,也可以是分子间的,连接不

同多肽链^[16]。其他的贝壳基质蛋白中, KRMP 是一类基质蛋白,其成熟蛋白呈碱性,富含与蛋白交联有关的赖氨酸(Lys)、酪氨酸(Tyr)和 Cys,通过二硫键参与将酸性蛋白锚定于棱柱层基质蛋白支架上^[17]。一些框架蛋白通常含有 Cys 残基^[18]。CYSRICHIN-F 蛋白的亲疏水性结构交替出现,在二级结构分析中 α 螺旋结构占比 11%, β 折叠区域占比 23%, CYSRICHIN-F 可能通过其 β 折叠结构与有机框架相连接,有助于构建基质蛋白的框架结构。这一作用可能为其他基质成分的沉积提供了基础,同时也可能在积极调控晶体的成核和生长过程中起到关键作用。

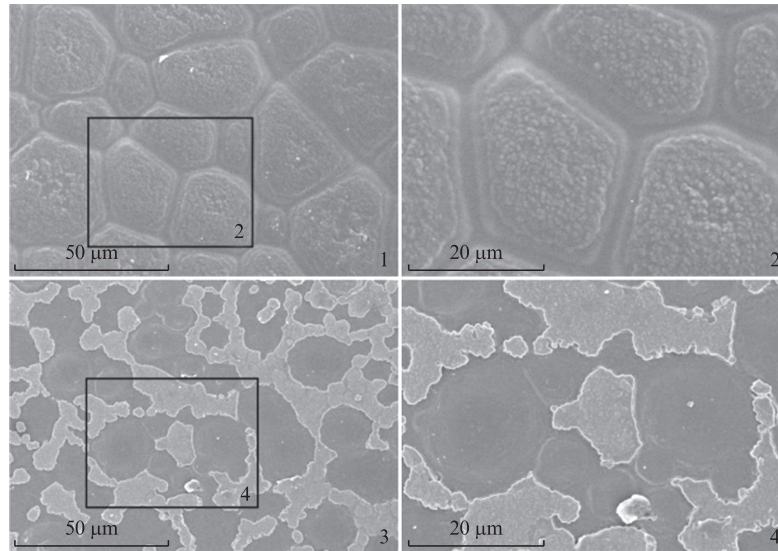
三角帆蚌的外套膜在贝壳形成中扮演着至关重要的角色。外套膜的表皮细胞能够分泌有机基质,这些基质对碳酸钙晶体的形成和生长具有调控作用^[10]。外套膜的边缘膜外褶内上皮细胞分泌与棱柱层形成相关的蛋白,外褶缘膜部参与珍珠层的形成,位于外褶和中褶之间的壳皮沟与角质层的形成密切相关^[19]。实验结果预示着 CYSRICHIN-F 是 1 个参与角质层和棱柱层形成的基质蛋白。

壳修复是新生壳的重要再生过程,壳损伤后, CaCO_3 通过外套膜细胞分泌有机基质沉积在损伤部位,形成新生壳^[20]。在本研究中,破壳损伤后的第 6 天和第 18 天 *cysrichin-F* 的表达量显著增加。之前的研究^[21]表明,破壳后的 0~6 d 是角质层形成阶段,角质层形成后紧密附着于外套膜上,使软体动物与外界环境隔绝。破壳后的 6~29 d 为碳酸钙无序沉积阶段,棱柱层开始形成^[22],表明其影响着角质层与棱柱层的形成。棱柱层特有基质蛋白 HIC31 破壳后的表达量在棱柱层形成时期显著升高,参与促进了文石成核^[23]。Hc-transgelin 在壳再生过程中对棱柱层和珍珠层的形成起重要作用,在 12~25 d 实验组的相对表达量显著高于对照组^[24]。因此推测基质蛋白 CYSRICHIN-F 参与贝壳角质层和棱柱层的形成。

基质蛋白在生物矿化过程中充当模板和催化剂,有助于晶体的有序排列和 CaCO_3 的沉积^[23]。在矿化之前,丝状蛋白填充几丁质框架并抑制酸性成核位点结晶。矿化后,这些位点在晶体板之间紧密闭合,成为有机层的一部分^[8]。丝状蛋白中的 Cys 残基可以通过形成分子间和分子内二硫键

促进有机基质的交联,增强有机框架的稳定性^[25]。有机框架的组装是 CaCO_3 矿化的基础。本研究干扰了基质蛋白基因 *cysrichin-F* 的表达,影响了有机框架的形成过程,导致棱柱层的形成受阻。之前的研究中,当马氏珠母贝基质蛋白基因 *Pm-PNU7* 和 *Pif* 表达下调后,实验组新生贝壳的珍珠层和棱柱层内表面超微结构均出现不同程度的紊乱^[26-27]。基质蛋白 PU14 进行

RNAi 实验后,观察到贝壳棱柱层晶体的间隙变大,多边形晶体边缘变得粗糙,晶体表面呈现凹凸不平状态^[28]。对基质蛋白 PfmPif97-like 进行干扰后^[29]也有相似的结果,它们都导致了棱柱层的无序生长。而实验组与对照组的珍珠层在 SEM 下变化不大,因此 *cysrichin-F* 基因只对棱柱层形成有影响,是 1 个调节棱柱层生物矿化的基质蛋白。

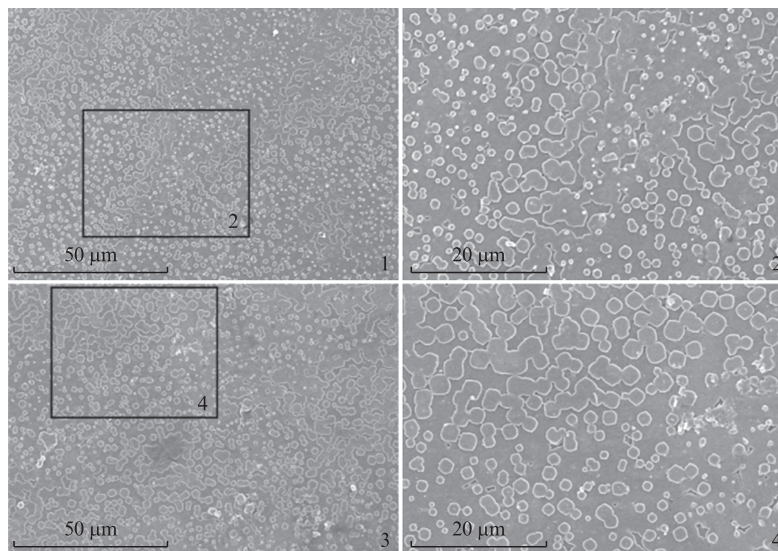


1 和 2 为对照组,2 是 1 的放大图;3 和 4 为实验组,4 是 3 的放大图。

1 and 2 are the control group, 2 is the magnification of 1; 3 and 4 are the experimental group, and 4 is the magnification of 3.

图版 I 三角帆蚌 RNAi 后壳表面棱柱层的晶体形态

Plate I Crystal morphology of the prismatic layer on the surface of *H. cumingii* after RNAi



1 和 2 为对照组,2 是 1 的放大图;3 和 4 为实验组,4 是 3 的放大图。

1 and 2 are the control group, 2 is the magnification of 1; 3 and 4 are the experimental group, and 4 is the magnification of 3.

图版 II 三角帆蚌 RNAi 后壳表面珍珠层的晶体形态

Plate II Crystal morphology of the pearl layer on the surface of *H. cumingii* after RNAi

总之,基质蛋白 CYSRICHIN-F 是 1 个参与角质层和棱柱层形成的新的碱性贝壳基质蛋白,同时 CYSRICHIN-F 作为 1 个框架蛋白参与调控棱柱层有机框架的形成。这将有助于进一步揭示三角帆蚌生物矿化的分子基础,深入理解三角帆蚌基质蛋白在贝壳形成过程中发挥的功能与作用。

作者声明本文无利益冲突。

参考文献:

- [1] YAN X, ZHANG Q, MA X Y, et al. The mechanism of biomineralization: progress in mineralization from intracellular generation to extracellular deposition [J]. Japanese Dental Science Review, 2023, 59: 181-190.
- [2] LOUIS V, BESSEAU L, LARTAUD F. Step in time: biomineralisation of bivalve's shell [J]. Frontiers in Marine Science, 2022, 9: 906085.
- [3] JANISZEWSKA K, STOLARSKI J, BENZERARA K, et al. A unique skeletal microstructure of the deep-sea micrabaciid scleractinian corals [J]. Journal of Morphology, 2011, 272(2): 191-203.
- [4] STOLARSKI J, KITAHARA M V, MILLER D J, et al. The ancient evolutionary origins of Scleractinia revealed by azooxanthellate corals [J]. BMC Evolutionary Biology, 2011, 11(1): 316.
- [5] WEINER S, TRAUB W. Macromolecules in mollusc shells and their functions in biomineralization [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 1984, 304(1121): 425-434.
- [6] MAO Y, MIAO Y, ZHU X, et al. Expression of bone morphogenetic protein 10 and its role in biomineralization in *Hyriopsis cumingii* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023: 127245.
- [7] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold [J]. Nature, 2021, 596(7873): 583-589.
- [8] MANN S. Molecular recognition in biomineralization [J]. Nature, 1988, 332(6160): 119-124.
- [9] YANO M, NAGAI K, MORIMOTO K, et al. Shematin: 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.
- [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] 曹慕莲, 霍滢朵, 刘宗雨, 等. 雌性三角帆蚌 *Srd5a1* 基因的分子鉴定和功能研究 [J]. 上海海洋大学学报, 2024, 33(2): 297-307.
- CAO M L, HUO Y D, LIU Z Y, et al. Molecular identification and functional study of *Srd5a1* in female *Hyriopsis cumingii* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2024, 33(2): 297-307.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] JIN C, LI J L, LIU X J. Teosin, a novel basic shell matrix protein from *Hyriopsis cumingii* induces calcium carbonate polycrystal formation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 150: 1229-1237.
- [15] SCHULTE L, MAO J F, REITZ J, et al. Cysteine oxidation and disulfide formation in the ribosomal exit tunnel [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 5569.
- [16] BECHTEL T J, WEERAPANA E. From structure to redox: the diverse functional roles of disulfides and implications in disease [J]. Proteomics, 2017, 17(6): 1600391.
- [17] 张岑. 合浦珠母贝贝壳形成相关蛋白及基因的研究 [D]. 北京: 清华大学, 2006.
- ZHANG C. Studies on the proteins and genes involved in the shell formation of *Pinctada fucata* [D]. Beijing: Tsinghua University, 2006.
- [18] GOTLIV B A, KESSLER N, SUMEREL J L, et al. Asprich: a novel aspartic acid-rich protein family from the prismatic shell matrix of the bivalve *Atrina rigida* [J]. ChemBioChem, 2005, 6(2): 304-314.
- [19] FUNABARA D, OHMORI F, KINOSHITA S, et al. Novel genes participating in the formation of prismatic and nacreous layers in the pearl oyster as revealed by their tissue distribution and RNA interference knockdown [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84706.
- [20] HÜNING A K, LANGE S M, RAMESH K, et al. A shell regeneration assay to identify biomineralization candidate genes in mytilid mussels [J]. Marine Genomics, 2016, 27: 57-67.
- [21] CHECA A. A new model for periostracum and shell formation in Unionidae (Bivalvia, Mollusca) [J]. Tissue and Cell, 2000, 32(5): 405-416.
- [22] LIU X J, JIN C, LI H R, et al. Morphological structure of shell and expression patterns of five matrix protein genes during the shell regeneration process in *Hyriopsis cumingii* [J]. Aquaculture and Fisheries, 2018, 3(6): 225-231.

- [23] YAN Y, YANG D, YANG X, et al. A novel matrix protein, PFY2, functions as a crucial macromolecule during shell formation [J]. Scientific Reports, 2017, 7 (1): 6021.
- [24] YUAN Y B, HU H H, LI J L, et al. *Hc-transgelin* is a novel matrix protein gene involved in the shell biomineralization of triangle sail mussel (*Hyriopsis cumingii*) [J]. Aquaculture and Fisheries, 2024, 9 (4): 543-550.
- [25] ZHANG X, XIA Z H, LIU X J, et al. The novel matrix protein *hic7* of *Hyriopsis cumingii* participates in the formation of the shell and pearl [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2021, 256: 110640.
- [26] 黄荣莲, 范闪闪, 杜晓东. 马氏珠母贝贝壳基质蛋白基因 *Pm-PNU7* 的克隆和功能研究[J]. 广东海洋大学学报, 2019, 39(1): 22-29.
- [27] HUANG R L, FAN S S, DU X D. Cloning and functional analysis of the matrix protein gene *Pm-PNU7* from the pearl oyster *Pinctada martensii* [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2019, 39(1): 22-29.
- [28] SUZUKI M, SARUWATARI K, KOGURE T, et al. An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation[J]. Science, 2009, 325(5946): 1388-1390.
- [29] JI Y H, YANG X, YANG D, et al. PU14, a novel matrix protein, participates in pearl oyster, *Pinctada fucata*, shell formation [J]. Marine Biotechnology, 2021, 23 (2): 189-200.
- [30] XIONG X W, XIE B Y, ZHENG Z, et al. *PfmPif97-like* regulated by *Pfm-miR-9b-5p* participates in shell formation in *Pinctada fucata martensii* [J]. PLoS One, 2019, 14(12): e0226367.

Sequence and functional analysis of the matrix protein gene *cysrichin-F* in *Hyriopsis cumingii*

LIANG Chenchen¹, LIU Xiaojun², WANG Guiling¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Department of Biotechnology and Biomedicine, Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Jiaxing 314000, Zhejiang, China)

Abstract: Matrix proteins play a crucial role in regulating the formation of inorganic minerals. In order to investigate the effect of matrix proteins in *Hyriopsis cumingii* on shell biomineralization, this study isolated a new matrix protein gene *cysrichin-F* from *H. cumingii*, and further explored its biological function using techniques such as in situ hybridization, shell-breaking repair and RNA interference (RNAi). The results showed that the full length of *cysrichin-F* sequence was 592 bp, and the open reading frame (ORF) region was 42-389 bp, encoding a total of 115 amino acids. The protein encoded by this gene has a theoretical molecular weight of 12.895 ku and a theoretical isoelectric point of 8.65, making it an alkaline protein. The front 23 amino acids of *CYSRICHIN-F* are signal peptides. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) detection revealed that the expression level of this gene in the mantle was relatively high compared to other tissues. Through in situ hybridization and shell-breaking repair techniques, it was found that *cysrichin-F* was involved in the formation of the cuticle and prismatic layers of shells. After interference with this gene, the structure of the shell prismatic layer would be disrupted, ultimately resulting in an irregular shape of the shell prismatic layer. This study showed that *cysrichin-F* was involved in the biomineralization process of the cuticle and prism layers of shells. The results of the study can help to elucidate the molecular mechanism of the biomineralization in *H. cumingii*, and provide a theoretical basis for the role of matrix proteins in the formation of shells in *H. cumingii*.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; matrix proteins; in situ hybridization; shell-breaking repair; RNA interference