

瘤背石磺表皮生长因子基因的克隆、结构及进化分析

杨铁柱, 沈和定, 史艳梅, 刘欣, 吴欣, 李杰

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 首次在瘤背石磺(*Onchidium struma*)中克隆得到一种新的表皮生长因子(EGF)的 cDNA 序列全长。EGF 基因 cDNA 的全长为 1158bp, 命名为 *Os-egf1*, 其中开放阅读框长度为 846 bp, 编码一条包含 281 个氨基酸残基的多肽链。根据氨基酸序列比对和结构域分析结果发现其含有 2 个保守的 EGF 结构域和 1 个 EGF-like 结构域, 每个结构域中均包含至少 6 个半胱氨酸残基, 且形成 CX7 CX4-5 CX10-13 CXCX8 C 结构, 其结构域由 C1~C3、C2~C4 和 C5~C6 之间形成的 3 个二硫键维持, 符合表皮生长因子家族及其相关蛋白的特征结构域, 但其余氨基酸序列与现有相关基因差异较大, 推测可能是一种新的 EGF-like 基因。利用 MEGA6.0 软件构建 *Os-egf1* 与 EGF 家族相关蛋白的系统进化树, 表明 EGF 家族蛋白具有一定的物种特异性。

关键词: 瘤背石磺(*Onchidium struma*); EGF; 基因克隆; 系统进化分析

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)03-0008-09

DOI: 10.11759/hyxx 20160121002

瘤背石磺(*Onchidium struma*)隶属于软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、肺螺亚纲(Pulmonata)、缩眼目(Systellommatophora)、石磺科(Onchidiidae), 是一种具有很高的食用和药用价值的贝类^[1-3]。其分布区域常见于我国的江苏、上海、浙江、福建、广东等地的淡水和咸水交汇处的高潮带, 其温度适应性强, 分布范围广, 资源量非常丰富。目前国内外学者对石磺的研究主要集中在系统分类^[4-5]、生物学特征、胚胎发育、营养价值、受精和繁殖机制以及活性物质的分离提取等方面^[6-8], 未涉及功能基因组的范畴, 本文对于瘤背石磺功能基因的结构和进化进行了较为深入的分析, 希望能为瘤背石磺的功能基因研究积累资料。

EGF(Epidermal growth factor)是由 Cohen^[9]博士在 1962 年一次实验中偶然发现的, 也是最早发现并确立结构的生长因子。随后的研究表明, EGF 广泛存在于人类及其他动物体内, 从低等到高等、单细胞到多细胞、海洋到陆地均能发现其存在。EGF 并不是单一的生长因子, 而是一个有众多生长因子所组成的大家族, 它包括转化生长因子- α (transforming growth factor- α , TGF- α)、肝素结合性表皮生长因子(heparin binding EGF, HB-EGF)、双调蛋白(amphiregulin, AR)、细胞素(betacellulin, BTC)、神经调节素(neuregulin, NGR)与表皮素(epiregulin, EPR)等^[10]。这些因子中都包含至少 1 个由 3 对二硫键所维持具有高度保守性

的 EGF-like 结构域^[11]。在生物学过程中, EGF 需要与 EGF 受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)相结合, 形成同源或异源二聚体, 以引发诸如 ras-raf-MEK-erk/MAPK 和 P13K-PKC-IKK 等下游信号通路, 介导细胞间的信号传导, 促进细胞内部相应 DNA、RNA 和蛋白质的合成分泌, 从而诱导细胞进行增殖、迁移和分化等生物学过程^[12-13]。

目前对于 EGF 的研究主要集中在人类等高等脊椎动物上, 例如 EGF 在肿瘤细胞中的表达水平变化情况^[14]、在中枢神经系统中的重要性^[15]以及对烧伤创面修复的临床应用^[16]等, 然而在无脊椎动物, 尤其是海洋生物中涉及甚少。朱文杰等^[17]从合浦珠母贝(*Pinctada martensii*)中克隆得到 EGF 同源基因 *Pf-egf1*, 并发现在肠道修复和幼虫表态发育阶段起着重要作用。Hermann 等^[18]从静水椎实螺(*Lymnaea stagnalis*)中克隆得到 EGF 同源基因 *L-egf*, 发现其在生长及损伤修复过程中发挥重要作用。以及 Hursh^[19]和 Bisgrove^[20]在紫球海胆(*Strongylocentrotus purpu-*

收稿日期: 2016-06-19; 修回日期: 2016-11-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41276157); 上海高校水产学一流学科建设项目

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 41276157; Shanghai Fisheries College discipline construction project]

作者简介: 杨铁柱(1990-), 男, 河南周口人, 硕士研究生, 主要从事海洋贝类功能基因研究, E-mail: yangtiezhu1234@163.com; 沈和定, 通信作者, 教授, 电话: 021-61900446, E-mail: hdshen@shou.edu.cn

ratus)、Woods^[21]和 Eri^[22]从海鞘(*Herdmania curvata*)中均克隆出 EGF 家族相关基因。

本实验采用瘤背石磺作为研究对象, 主要是由于其作为栖息于滩涂半咸水区域的两栖性生物方便采集。另外, 在采集后的暂养工作在本实验室已趋于成熟。而在摄食和运动过程中, 瘤背石磺直接与外界接触的表皮有大量损耗, 也相应刺激表皮生长因子的表达。故在本实验中选取瘤背石磺作为研究客体。

作者首次从瘤背石磺的背部表皮中克隆并鉴定出一个 EGF-like 基因, 并从结构和进化两方面进行深入分析, 发现 EGF-like 基因具有一定的物种特异性, 为进一步研究 *Os-egf1* 基因奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料与amp;主要试剂

实验所用的瘤背石磺采自上海市东海大桥沿岸的芦苇荡, 并放置于实验室暂养箱中暂养, 定时向箱内投放玉米粉、添加清水、清理排泄物, 及时清除掉死亡个体。实验前选取健康活力强、体长 50 mm 左右的个体, 并用清水洗净其身体表面的附着物。

实验所用的 RNA 提取试剂盒、2**Taq* PCR Mix、DH5- α 感受态细胞购自天根(北京)生化科技有限公司; LA-*Taq* 酶、反转录试剂盒(RT reagent Kit with gDNA Eraser)、RACE 试剂盒(含 5'和 3')购自 TAKARA 公司; 琼脂糖、LB 培养基、DNA 片段纯化试剂盒、三氯甲烷、异丙醇等购自生工生物工程(上海)有限公司; pGEM-easy vector 购自 Promega 公司; 核酸电泳缓冲液购自莱峰生物公司。实验中所用到的引物合

成及序列测定工作均由生工生物工程(上海)有限公司完成。

1.2 RNA 提取与amp;cDNA 合成

取瘤背石磺的背部皮肤, 按照 RNA 提取试剂盒的说明书提取总 RNA, 使用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测完整性并使用超微量分光光度计(Nano Drop ND-2000/2000C, Thermo Fisher Scientific, USA)测其核酸浓度和 A_{260}/A_{280} 后置于超低温冰箱中保存备用^[23]。利用 RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒合成 cDNA 第一链; 利用 TaKaRa 3'Full RACE Kit 合成 3RACE-cDNA, 用 5'Full RACE Kit 合成 5RACE-cDNA, 于-20℃保存备用。

1.3 EGF-like 的基因克隆

根据瘤背石磺转录组序列中得到的 EGF-like 基因片段, 利用 Primer 5.0 软件设计出引物 F1、R1 扩增目的片段(表 1)。利用引物已知的 T_m 值, 设计温度梯度实验, 确定最适退火温度 61.7℃。50 μ L PCR 反应体系为 2**Taq* PCR Mix 25 μ L, ddH₂O 20 μ L, 上下游引物(F/R)(10 μ mol/L)各 1.5 μ L, cDNA 2 μ L。PCR 反应条件为 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 61.7℃ 30 s, 72℃ 1 min, 循环 35 次; 72℃ 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳后使用 DNA 胶回收试剂盒纯化目的片段, 并将目的片段连接到 pGEM-easy vector 载体上, 转化进入到大肠杆菌感受态细胞 *E.coli* DH5- α , 在 LB/AMP 固体平板上 37℃培养, 经蓝白斑筛选和菌液 PCR 检测后将阳性克隆送生工测序, 并将所得序列结果与已知序列进行比对。

表 1 实验中所用到的引物序列

Tab.1 Sequences of primers used in this study

引物名称	序列(5'-3')	用途
F1	ACTTCACCGACAGGAAACCA	目的片段克隆
R1	CTGCTGTGGCTCAGGATTGC	目的片段克隆
3'GSP-F1	CCCCTGCCACAACACCA	3'RACE
3'GSP-F2	GCCGATCTGCCATCACGT	3'RACE
5'GSP-F1	CAGCGGAGGCTACAGGTACGGTTG	5'RACE
5'GSP-F2	TACGGTTGCAGTCGCTGCCATAGA	5'RACE

根据测序得到的目的片段, 分别设计 5'和 3'RACE 特异性引物(表 1), 以 3'RACE-cDNA 和 5'RACE-cDNA 为模板, 按照 TAKARA RACE 说明书中步骤分别进行 3'RACE 和 5'RACE 反应, 所得 PCR 产物经琼脂糖

电泳、割胶回收、连接转化后, 通过蓝白斑筛选和菌液 PCR 检测后将阳性克隆送生工测序。使用 DNAMAN6.0 软件将 3 次测序结果进行拼接, 获得基因的 cDNA 全长序列。

1.4 序列特征和结果分析

使用 NCBI 中 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)查找基因的开放阅读框(ORF);使用 BioEdit 和 DNASTAR 软件预测氨基酸序列;使用 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)来预测所编码蛋白的理化性质;使用 SignalP4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)来预测蛋白质的信号肽序列;使用 TMHMM services 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)来预测蛋白质的跨膜结构域;使用 NetPhos2.0 Serber(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)来预测蛋白质的磷酸化位点;使用 SubLoc v1.0(<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/>)对蛋白质进行亚细胞定位;使用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析蛋白质的功能结构域;使用 Mega6.0 软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 EGF-like 基因的基因克隆

通过对瘤背石磺转录组数据的综合分析比对,发现转录组数据中的 S_Unigene427_c2_seq6 基因被描述为 epidermal growth factor-like, 且与 NCBI 数据库比对后发现其与 multiple epidermal growth factor-like domains protein 10 (*Biomphalaria glabrata*)相似度最为接近。

根据该核苷酸序列在其保守区设计验证引物,获得 802 bp 的 PCR 扩增产物。用 BioEdit 进行双序列比对结果显示,该片段与待验证核苷酸序列中被扩引物之间的序列 99%的一致,覆盖度达到 67.57%,一方面证明该序列的正确性,可以应用于 cDNA 全长的克隆;另一方面也发现原预测的核苷酸序列存在一定的缺失,或是基因测序拼接的不完整性造成的^[24]。

3'RACE 扩增得到一条 569 bp 的片段,包含加尾信号(AACAAA)和 poly(A)尾巴。5'RACE 扩增得到一条 301bp 的片段。将上述序列片段进行拼接后,得到一条全长为 1158bp 的 cDNA 序列(GenBank 登录号:KU556757),通过 blastx 比对分析,确定该基因属于 EGF 大家族。其中开放阅读框长 846 bp,编码一条长为 281 个氨基酸残基的多肽链,终止密码子为 TGA,加尾信号位于 1129~1134,后面紧跟着 poly(A)尾巴。5'UTR 长度为 166 bp,3'UTR 长度为 130 bp(图 3)。

2.2 EGF-like 基因的 cDNA 序列分析

通过 RACE 克隆技术获得的瘤背石磺表皮生长

因子(EGF-like)基因命名为 *Os-egf1*。ProtParam 软件预测其分子量为 30.51 ku,理论等电点(PI)是 5.41。SignalP4.1 信号肽预测 *Os-egf1* 没有信号肽序列,跨膜结构预测软件 TMHMM services 2.0 显示该基因存在一个跨膜结构域(膜内 1~16aa,膜上 17~39aa,膜外 40~281aa)。磷酸化位点预测软件 NetPhos2.0 Serber 显示 *Os-egf1* 基因含有 6 个 Ser、3 个 Thr、3 个 Tyr,可能为蛋白激酶磷酸化位点。细胞定位预测表明 *Os-egf1* 基因定位在细胞外,是分泌性蛋白的可能性较大。功能结构域预测软件 SMART 显示 *Os-egf1* 基因含有 2 个 EGF 结构域(46~77aa、139~170aa)和一个 EGF-like 结构域(92~137aa),每个 EGF 结构域均包含 6 个半胱氨酸残基,结构域内部各自形成 3 个二硫键,EGF-like 结构域包含 8 个半胱氨酸残基。使用 SWISSmodel 软件对 *Os-egf1* 氨基酸序列进行三维结构预测,结果如图 1。

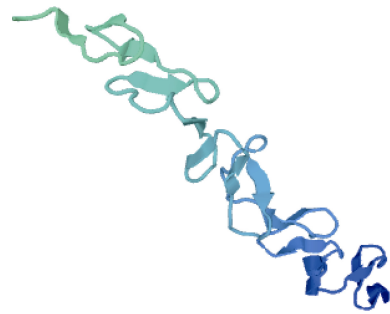


图 1 *Os-egf1* 氨基酸序列的三维结构预测图

Fig.1 Three-dimensional structure prediction map of *Os-egf1* amino acid sequence

将 *Os-egf1* 的氨基酸序列在 NCBI 中 Blast 同源性比对得知,与其匹配度最高的是腹足纲生物 *Biomphalaria glabrata* 中的 multiple epidermal growth factor-like domains protein 10 蛋白序列(XP_013086610.1),匹配度达到 51%。相似度较低一点的是 *Crassostrea gigas*,同样是 multiple epidermal growth factor-like domains protein 10 的蛋白序列(XP_011433900.1),同源性为 43%。将两者的氨基酸序列同 *Os-egf1* 进行多重序列比对后,结果如图 2 所示。

瘤背石磺 *Os-egf1* 基因 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列如图 3 所示。

使用 BioEdit 软件将瘤背石磺 *Os-egf1* 基因的 3 个 EGF-like 结构域同 EGF 家族及其相关蛋白的 EGF-like 结构域做比较,结果表明 *Os-egf1* 与 EGF 家族及相关蛋白的 6 个半胱氨酸残基是高度保守的,且均符合 CX7 CX4-5 CX10-13 CXCX8 C 结构,如图 4。

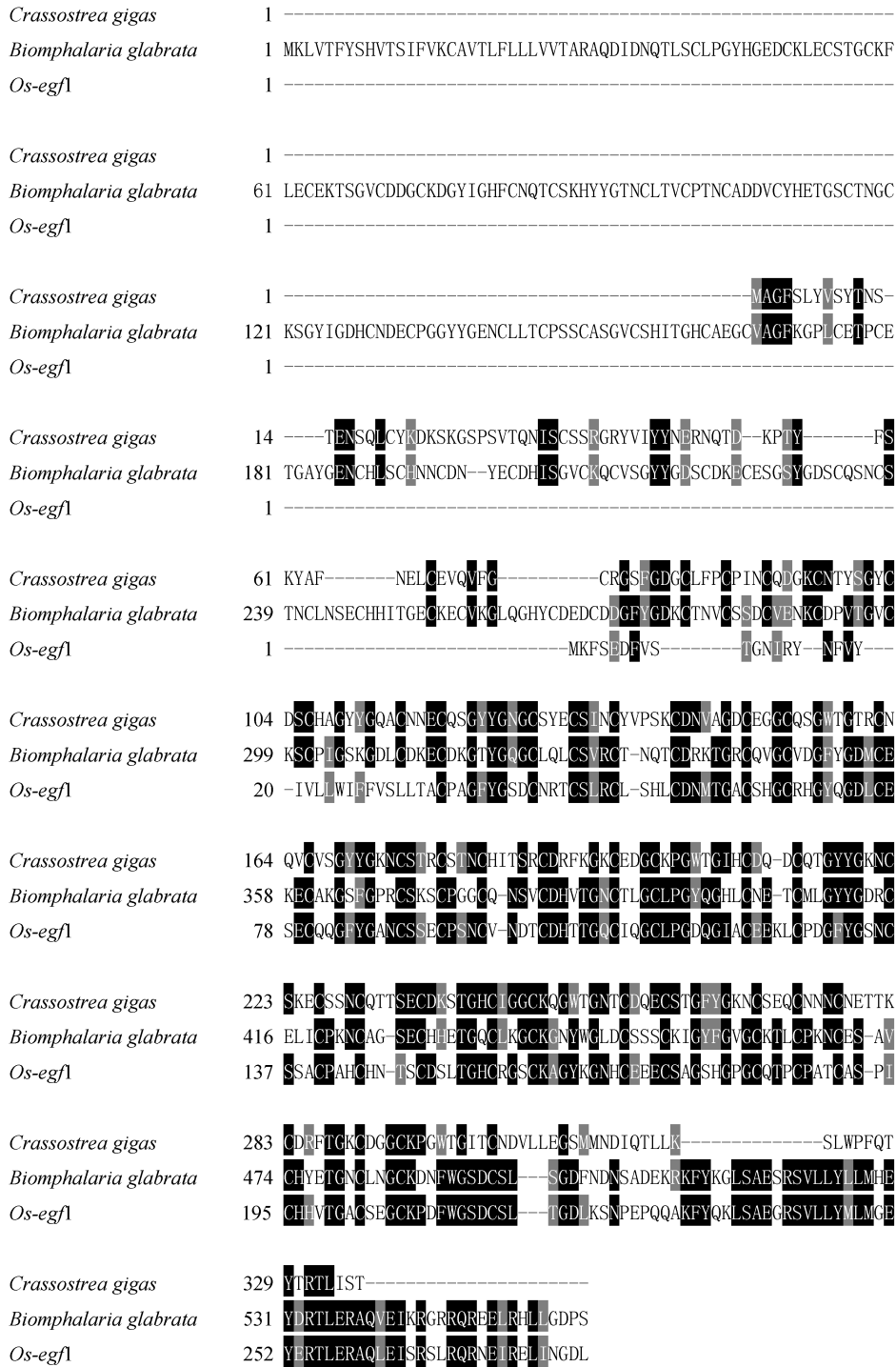


图 2 *Os-egf1* 的氨基酸序列与同源性较高的 EGF-like 的多重序列比对结果

Fig.2 The result of multiple sequence alignment of *Os-egf1* amino acid sequence with EGF-like gene

使用 Mega6.0 软件, 对瘤背石磺 *Os-egf1* 及 EGF 家族其他成员的氨基酸序列进行比对并构建系统进化树图 5。结果表明, 大体上 EGF 家族每个成员的不同物种基因相应的聚为群组。*Gryllus bimaculatus* 的

TGF- α 蛋白单独聚为一支, 小家鼠(*Mus musculus*)和人类(*Homo sapiens*)的相关蛋白聚为一支, *Os-egf1* 单独聚为一支, 剩余 4 种的 EGF 相关蛋白形成两支又聚为一支。

```

1   GAAAATTGCTAGAAAGATTATTAACAAATAGAGCGCTCTCAGCATAAGAAACTTCACCGA
61  CAGGAAACCATCGTTGTAAAAACACATTTAGATCTACACTGGCATTGTGGCCTTCTTATC
121 CTCTGTTTCAACTCATTTTTTCTGAAACAGCTTTCGGGGAAAAGATGAAATTCAGTGAG
1   M K F S E
181 GATTTTGTATCCACTGGAAATATACGATATAACTTCGTGTATATTGTTCTGTATTGGATA
6   D F V S T G N I R Y N F V Y I V L L W I
241 TTCTTCGTATCGCTACTGACAGCTTGCCCGGCAGGTTTCTATGGCAGCGACTGCAACCGT
26  F F V S L L T A C P A G F Y G S D C N R
301 ACCTGTAGCCTCCGCTGTCTATCACATCTGTGTGACAACATGACAGGGGCTGCTCGCAT
46  T C S L R C L S H L C D N M T G A C S H
361 GGCTGCCGGCACGGCTATCAGGGCGACCTGTGCGAATCTGAATGTCAGCAAGGATTCTAC
66  G C R H G Y Q G D L C E S E C Q Q G F Y
421 GCGCTAACTGTTCTTCTGAATGTCCGTCTAACTGTGTCAACGACACCTGTGACCACACA
86  G A N C S S E C P S N C V N D T C D H I
481 ACTGGCCAGTGTATCCAGGGCTGCCTGCCTGGAGATCAAGGGATCGCCTGTGAGGAAAAG
106 T G Q C I Q G C L P G D Q G I A C E E K
541 CTATGTCCAGATGGATTCTACGGCAGCAACTGTTCTCTGCCTGCCCTGCCACTGCCAC
126 L C P D G F Y G S N C S S A C P A H C H
601 AACACCAGCTGTGATTCACTGACGGGCCACTGTAGAGGGAGTTGTAAGGCTGGATACAAG
146 N T S C D S L T G H C R G S C K A G Y K
661 GGCAACCACTGCGAGGAAGAGTGCAGTGCAGGAAGCCACGGTCCAGGCTGTCAGACCCCA
166 G N H C E E E C S A G S H G P G C Q T P
721 TGTCCAGCCACCTGTGCCTCGCCGATCTGCCATCACGTTACCGGCGCCTGCTCAGAGGGT
186 C P A T C A S P I C H H V T G A C S E G
781 TGTA AACCGGATTTCTGGGGCAGTGACTGCAGCTTAACTGGAGGTTTGAAGAGCAATCCT
206 C K P D F W G S D C S L T G G L K S N P
841 GAGCCACAGCAGGCCAAATTTTACCAGAACTTTCTGCGGAAGGTCGCAGTGTGTTGCTG
226 E P Q Q A K F Y Q K L S A E G R S V L L
901 TACATGCTGATGGGGGAATACGAGCGCACGCTAGAGAGAGCACAGTTGGAGATCAGCAGG
246 Y M L M G E Y E R T L E R A Q L E I S R
961 AGCCTCAGGCAACGAAATGAAATTCGGGAGTTGATCAACGGAGATCTCTGATGGAGAAC
266 S L R Q R N E I R E L I N G D L *
1021 GGGCTGGCCGGCGCGGGATCATCTACCAATCAAAATTTGGACACTTAACTGTCTTTCAT
1081 CTCTGAAGAAGCGGGCGTGTGCGAAAACACTAACAGGAGCTGAGCACTTAACTAAAGAGTTT
1141 GAAAGCACAAAAA
    
```

图 3 瘤背石磺 *Os-egf1* 基因 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Os-egf1* from *Onchidium struma*

图中蓝色字体为起始密码子和终止密码子，黑色加粗字体为加尾信号；阴影部分是保守的 EGF-like 结构域，红色字体为 6 个典型的半胱氨酸残基

Blue indicates the initiation codon and stop codon; bold black indicates polyadenylation signals; shadow indicates the conserved EGF-like domain; red indicates six typical cysteine residues

3 讨论

表皮生长因子(EGF)家族的研究报道在脊椎动物中比较丰富。本文利用瘤背石磺转录组，首次在该物种中克隆得到 EGF-like 基因 *Os-egf1*，通过功能结构域分析发现其包含 1 个跨膜结构域(17~39aa)、2

个 EGF 结构域(46~77aa、139~170aa)和一个 EGF-like 结构域(92~137aa)，将其与家族中其他成员及其相关蛋白的结构域比较，发现 *Os-egf1* 和他们有着相同的 EGF-like 结构特征，包含典型的 6 个半胱氨酸残基，且符合 CX7 CX4-5 CX10-13 CXCX8 C 结构，其中完全保守的 6 个半胱氨酸残基 C1~C3、C2~C4 和 C5~C6

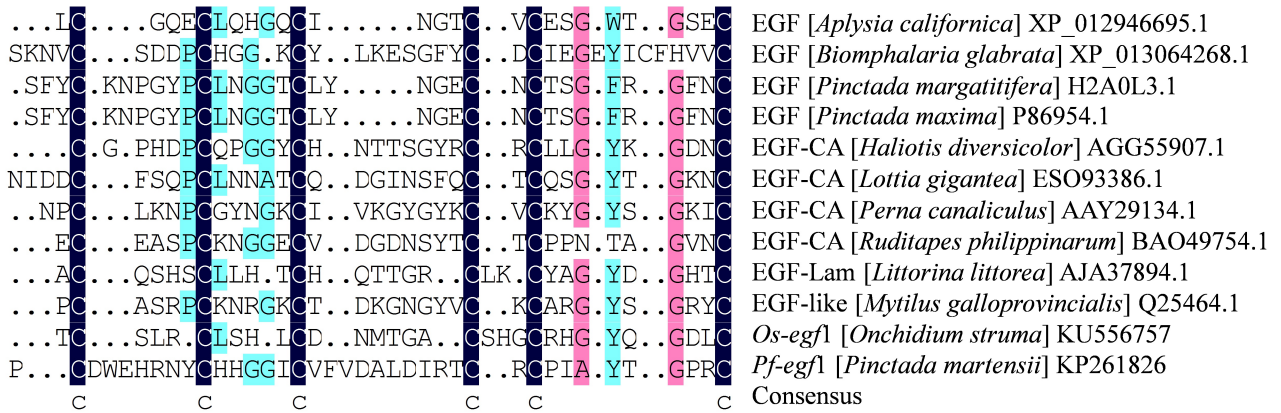


图 4 瘤背石磺 *Os-egf1* 与 EGF 家族及其相关蛋白 EGF-like 结构域比对

Fig.4 Alignment of EGF-like domain in *Os-egf1* with those in EGF family and its related proteins

字体 C 表示 6 个保守的半胱氨酸残基

C indicates six conserved cysteine residues

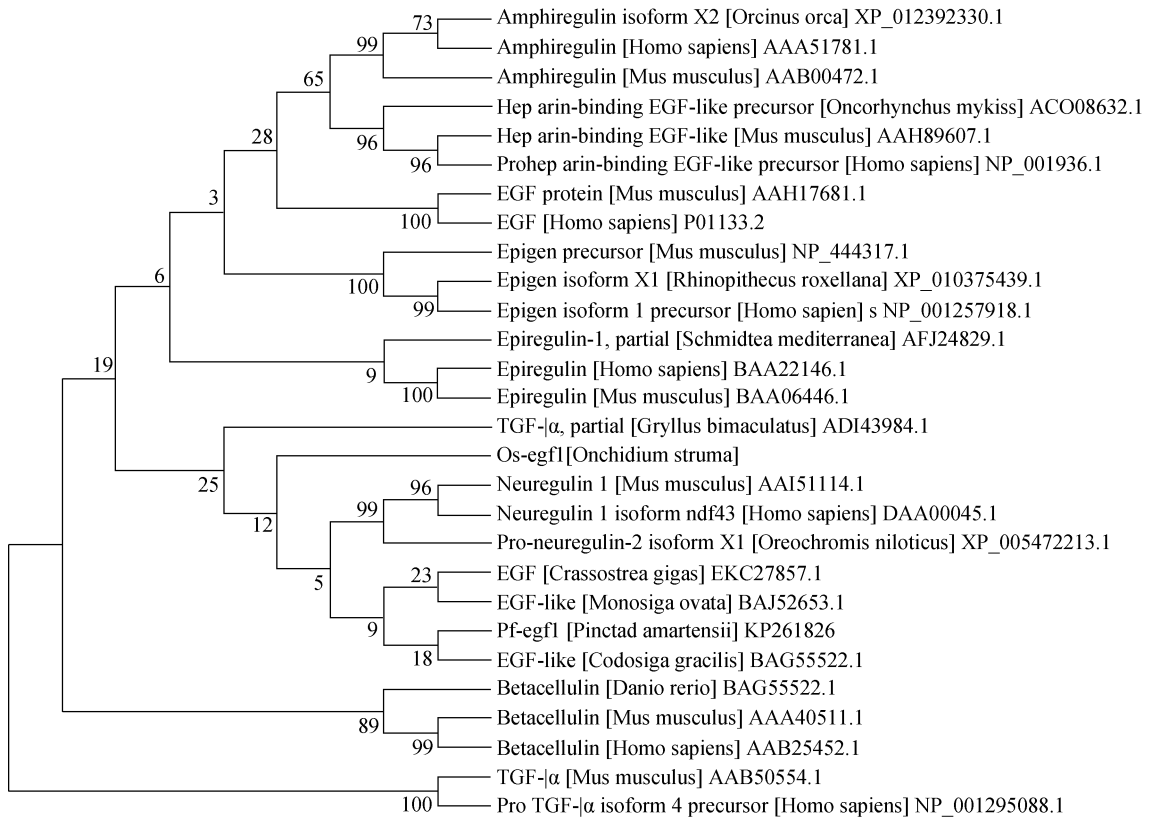


图 5 基于 *Os-egf1* 与 EGF 家族基因及其相关蛋白构建的系统进化树(MP 法)

Fig.5 Phylogenetic tree of *Os-egf1* and EGF family and its related proteins based on the Maximum Parsimony (MP) method

之间形成的 3 个二硫键, 使得这些多肽链能够形成相似的空间结构, 因而可以与 EGF 受体结合介导细胞间的信号传递。

EGF 家族蛋白在高等哺乳类动物中已能够广泛获取, 同时, 在海洋软体动物、两栖类生物甚至病毒细菌中均发现有 EGF-like 结构域, 可说明在物种的

进化过程中 EGF-like 结构域是相对保守的。目前在贝类中研究报道的 EGF 家族及其相关蛋白基因有 16 种之多, 例如太平洋牡蛎(*Pacific oyster*)的 EGF-like 基因^[25]、光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*)的 EGF 相关基因^[26]、新西兰青蚝(*Perna canaliculus*)的 EGF 相关基因^[27]、九孔鲍(*Haliotis diversicolor*)的 HdEGF1

基因^[28]、紫贻贝(*Mytilus edulis*)的 EGF 相关基因^[29]、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的 EGF_CA 相关基因^[30]、合浦珠母贝的 *Pf-egf1* 基因。将 *Os-egf1* 和上述基因的序列比对,结果表明除了 EGF-like 结构域之外(图 4),其余氨基酸序列并没有表现出相似性。而根据在 NCBI 上 BLAST 结果及多重序列比对显示, *Os-egf1* 同其他物种的 EGF-like 基因同源性并不高,最高仅为 51%,这也符合海洋生物之间基因差异较大的规律。以此推测 *Os-egf1* 基因是 EGF 家族及其相关蛋白基因的新成员。

EGF 家族蛋白在人类高等生物中的分布和表达十分丰富,而且对其的研究也比较深入。S Kumar 发现,长期吸烟的人群会诱导 EGF 家族的肝素结和性表皮生长因子 HB-EGF 在巨噬细胞中过量表达,使人患胰腺癌的几率变大数倍^[31]。Hoda I 发现通过药物降低 EGF 和 EGFR 基因的表达量可以显著抑制艾氏腹水瘤生长^[32]。另外, Ito J 的研究发现呼吸道上皮损伤可以通过 HBEGF 和 TGF- α 来诱导 TGF- β 1 和 TGF- β 2 的表达量增加来达到修复效果,这同 EGF 家族细胞成员细胞素(BTC)在人体中的肠道等表皮易损伤的部位表达量较高时想吻合的^[33-34]。

本研究首次在瘤背石磺中克隆得到表皮生长因子类似(EGF-like)基因 *Os-egf1* 的 cDNA 全长序列,并对其从结构和进化两方面进行了生物学信息分析,分析结果表明 *Os-egf1* 可能是一个新的 EGF-like 基因。本研究为进一步研究 *Os-egf1* 的功能奠定基础。

参考文献:

- [1] 吴旭峰, 沈和定, 吴文健, 等. 我国华东沿海 4 种石磺形态学比较[J]. 动物学杂志, 2010, 6: 92-100.
Wu Xufeng, Shen Heding, Wu Wenjian, et al. Comparison on morphology of Onchidiidae in eastern coast of China [J]. Journal of Zoology, 2010, 6: 92-100.
- [2] 孙变娜, 沈和定, 吴洪喜, 等. 石磺营养价值、活性物质的研究现状及开发前景[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 14-17.
Sun Bianna, Shen Heding, Wu Hongxi, et al. The research status and development prospects of *Struma* nutritional value and active substance [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2013, 41(8): 14-17.
- [3] 孙变娜, 沈和定, 吴洪喜, 等. 崇明岛瘤背石磺的化学成分研究. 天然产物研究与开发[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(7): 987-989.
Sun Bianna, Shen Heding, Wu Hongxi, et al. Chemical constituents of onchidium struma from Chongming Island, Shanghai [J]. Natural Product Research and Development, 2014, 26(7): 987-989.
- [4] Sun B N, Chen C, Shen H D, et al. Species diversity of Onchidiidae (Eupulmonata: Heterobranchia) on the mainland of China based on molecular data [J]. Molluscan Research, 2014, 34 (1): 62-70.
- [5] 姚理想, 周娜, 沈和定, 等. 中国沿海平疣桑椹石磺 *COI* 基因的遗传多样性与遗传分化[J]. 中国水产科学, 2015, 22(4): 729-749.
Yao Lixiang, Zhou Na, Shen Heding, et al. Genetic diversity and differentiation of *Platevindex mortonifrom* the coastal area of China based on mitochondrial *COI* gene [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(4): 729-749.
- [6] 陈美英, 李建榜, 黄克蚕, 等. 瘤背石磺的生殖系统结构特点及生殖周期研究[J]. 四川动物, 2010, 3: 426-431.
Chen Meiyong, Li Jianbang, Huang Kecan, et al. Study on the structural characteristics of the reproductive system and reproductive cycle of *Onchidium struma*[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2010, 29(3): 426-431.
- [7] 程知庆, 沈和定, 姚理想, 等. 贝类多糖的生物活性研究现状及其药用价值[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(24): 17-19.
Cheng Zhiqing, Shen Heding, Yao Lixiang, et al. Biological activity status and medicinal value of shellfish polysaccharide [J]. Journal of Anhui Agri, 2015, 43(24): 17-19.
- [8] Sun Bianna, Shen Heding (Correspondence), Wu Hongxi, et al. Determination of chemical constituents of the marine pulmonate slug, *Paraoncidium reevesii* [J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2014, 13(12): 2071-2074.
- [9] Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor[J]. Annual Review of Biochemistry, 1979, 48(10): 6389-6402.
- [10] Wilson K J, Gilmore J L, Foley J, et al. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: Implications for cancer [J]. Pharmacology and Therapeutics, 2009, 122(1): 1-8.
- [11] Harris R C, Chung E, Coffey R J. EGF receptor ligands[J]. Experimental Cell Research, 2003, 284 (1): 2-13.
- [12] Herbst R S. Review of epidermal growth factor receptor biology [J]. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, 2004, 59 (2Suppl): 21-26.
- [13] Stortelers C, Souriau C, van Liempt E, et al. Role of the N-terminus of epidermal growth factor in ErbB-2 / ErbB-3 binding studied by phage display[J]. Biochemistry, 2002, 41 (27): 8732-8741.
- [14] Taherian A, Zadeh S M M, Ghani H, et al. ST6Gal1, Cox-2 and HB-EGF mRNA expression in breast cancer samples from Kashan, Iran[J]. Middle East Journal of

- Cancer, 2015, 6(1): 43-50.
- [15] Fallon J H, Seroogy K B, Loughlin S E, et al. Epidermal growth factor immuno reactive material in the central nervous system location and development[J]. *Nippon Ishikai Zasshi Journal of the Japan Medical*, 1968, 60(3): 207-212.
- [16] Gonul B, Erdogan D, Ozogul C, et al. Effect of EGF dosage forms on alkali burned corneal wound healing of mice.[J]. *Burn*, 1995, 21(1): 7-10.
- [17] 朱文杰, 黄桂菊, 张东玲, 等. 合浦珠母贝表皮生长因子样(EGF-like)基因的克隆与表达分析[J]. *水产学报*, 2015, 5: 648-657.
Zhu Wenjie, Huang Guijiu, Zhang Dongling, et al. Cloning and expressing of an novel EGF-like gene from *Pinctada martensii* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 5: 648-657.
- [18] Hermann P M, Van Kesteren R E, Wildering W C, et al. Neurotrophic actions of a novel molluscan epidermal growth factor.[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2000, 20(17): 6355-6364.
- [19] Hursh D A, Andrews M E, Raff R A. A sea urchin gene encodes a polypeptide homologous to epidermal growth factor [J]. *Science*, 1987, 237(4821): 1487-1490.
- [20] Bisgrove B W, Andrews M E, Raff R A. Fibropellins, products of an EGF repeat-containing gene, form a unique extracellular matrix structure that surrounds the sea urchin embryo [J]. *Developmental Biology*, 1991, 146(1): 89-99.
- [21] Woods R G, Roper K E, Gauthier M. Gene expression during early ascidian metamorphosis requires signalling by Hemps, an EGF-like protein[J]. *Development*, 2004, 131(12): 2921-2933.
- [22] Eri R, Arnold J M, Hinman V F. Hemps, a novel EGF-like protein, plays a central role in ascidian metamorphosis [J]. *Development*, 1999, 126 (24): 5809-5818.
- [23] 冯政夫, 王琳, 李文侠, 等. 海洋无脊椎动物组织总RNA提取方法的探讨[J]. *海洋科学*, 2014, 11: 24-28.
Feng Zhengfu, Wang Lin, Li Wenxia, et al. Extraction of total RNA from marine invertebrate tissue [J]. *Marine Sciences*, 2014, 11: 24-28.
- [24] 宋小瑞, 王晓通, 李莉, 等. 长牡蛎 nacrein 基因的克隆、结构及进化分析[J]. *海洋科学*, 2015, 10: 85-93.
Song Xiaorui, Wang Xiaotong, Li Li, et al. Molecular cloning and characterization of nacrein gene in *Pacific oyster (Crassostrea gigas)* [J]. *Marine Sciences*, 2015, 10: 85-93.
- [25] Zhang G, Fang X, Guo X, et al. The *oyster* genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation[J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 49-54.
- [26] Lockyer A E, Spinks J N, Walker A J, et al. *Biomphalaria glabrata* transcriptome: Identification of cell—signalling, transcriptional control and immune related genes from open reading frame expressed sequence tags (ORESTES) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2007, 31 (8): 763-782.
- [27] Zhao H, Waite J H. Coating proteins: structure and cross-linking in fp-1 from the green shell mussel *Perna canaliculus* [J]. *Biochemistry*, 2005, 44 (48), 15915-15923.
- [28] 张洁, 陈志森, 陈军, 等. 杂色鲍后消化道生长相关基因 *HdEGF1* 的研究[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2013, 04: 560-568.
Zhang Jie, Chen Zhishen, Chen Jun, et al. A study of *HdEGF1*, an EGF-related gene in the lower digestive tract from small abalone *Haliotis diversicolor* [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2013, 4: 560-568.
- [29] Inoue K, Takeuchi Y, Miki D, et al. Mussel adhesive plaque protein gene is a novel member of epidermal growth factor-like gene family[J]. *Biol Chem*, 1995, 270 (12), 6698-6701.
- [30] Kim J Y, Adhya M, et al. Characterization, tissue expression, and immunohistochemical localization of MCL3, a C-type lectin produced by *Perkinsus olseni*-infected *Manila clams (Ruditapes philippinarum)* [J]. *Fish and shellfish immunology*, 2008, 25(5): 598-603.
- [31] Kumar S, Torres M P, Kaur S, et al. Smoking accelerates pancreatic cancer progression by promoting differentiation of MDSCs and inducing HB-EGF expression in macrophages [J]. *Oncogene*, 2015, 34(16): 2052-2060.
- [32] Hoda I, Bahra, E A, et al. Chemopreventive effect of leflunomide against Ehrlich's solid tumor grown in mice: Effect on EGF and EGFR expression and tumor proliferation [J]. *Life Sci*, 2015, 141: 193-201.
- [33] Ito J, Harada N, Nagashima O, et al. Wound-induced TGF-beta 1 and TGF-beta 2 enhance airway epithelial repair via HB-EGF and TGF-alpha [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 412(1): 109-114.
- [34] Seno M, Tada H, Kosaka M, et al. Human betacellulin, a member of the EGF family dominantly expressed in pancreas and small intestine, is fully active in a monomeric form [J]. *Growth Factors*, 1996, 13(3-4): 181-191.

Molecular cloning and characterization of EGF-like gene in *Onchidium struma*

YANG Tie-zhu, SHEN He-ding, SHI Yan-mei, LIU Xin, WU Xin, LI Jie

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Received: Jun. 19, 2016

Key words: *Onchidium struma*; EGF; gene cloning; phylogenetic analysis

Abstract: The complete cDNA sequence of the EGF-like gene was cloned from *Onchidium struma* for the first time. cDNA of the EGF-like gene was named *Os-egf1*; it consisted of 1158 bp containing a 846-bp ORF that encoded a peptide of 281 amino acids. Multiple alignment and conserved domain analysis indicated that this peptide chain contained two conserved EGF domains and one EGF-like domain. Each domain contained at least six cysteine residues (CX7 CX4–5 CX10–13 CXCX8 C) that can form three disulfide bonds between C1 and C3, C2 and C4, and C5 and C6. These characteristics are consistent with the EGF protein family. However, the remaining sequences of *Os-egf1* were considerably different from other members of the EGF family. Thus, we proposed that *Os-egf1* is a novel EGF-like gene. A phylogenetic tree was built using MEGA6.0 to investigate the relationship between *Os-egf1* and proteins belonging to the EGF family. The study also suggested that proteins belonging to the EGF family are species-specific.

(本文编辑: 梁德海)