

曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)SCD 基因 全长 cDNA 的克隆和序列分析*

马明华 刘慧慧 迟长凤 吴常文

(浙江海洋学院海洋科学与技术学院 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316004)

提要 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(SCD)是脂肪代谢的关键酶。本研究采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆了曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)SCD cDNA 的全序列, 序列全长 1513bp, 由 261bp 的 5'非翻译区、编码 306 个氨基酸的 921bp 开放阅读框和 331bp 的 3'非翻译区组成。在线翻译所得多肽理论分子量为 34.92kDa, 等电点为 8.95, 是疏水性蛋白, 含有丰富的螺旋结构(45.10%), 存在 4 个跨膜区。其氨基酸序列与真蛸(*Octopus vulgaris*)和长牡蛎(*Crassostrea gigas*)相似性达到 91%, 与其它非软体动物也表现为 50%以上的相似性, 说明 SCD 结构相对保守; 系统进化树结果表明曼氏无针乌贼和真蛸及牡蛎进化关系最近, 与鱼类稍远, 与人及大鼠等哺乳动物亲缘关系最远。SCD 基因是改善曼氏无针乌贼肉质的重要候选基因, 其成功克隆及相关分析对于深入探讨软体动物脂肪酸代谢相关基因在生物体内作用机制及调控机理具有重要意义。

关键词 曼氏无针乌贼; SCD 基因; cDNA; 生物信息学

中图分类号 Q24

硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(stearoyl-coenzyme A desaturase, SCD)是脂肪酸去饱和化的关键限速酶, 催化饱和脂肪酰基 CoA Δ 9-cis 的去饱和化, 生成单不饱和脂肪酸(MUFAs), 其主要底物是棕榈酰 CoA(C16:0)和硬脂酰 CoA(C18:0), SCD 将它们分别转化为棕榈酰 CoA(C16:1)和油酰基 CoA(C18:1)(栾广春等, 2007)。棕榈油酸盐与油酸盐是膜磷脂、胆固醇脂、甘油三酯、脂蜡中 MUFAs 的主要组成部分, 而这些脂类中 MUFAs 与饱和脂肪酸(SFAs)的比例影响脂蛋白代谢、信号传导和生物膜流动性, 因此 SCD 近来成为脂肪代谢研究的热点。

曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)曾为东海区的四大海产之一, 具有较高的药用、营养和经济价值。20 世纪 90 年代后, 随着资源的大量开采和生态环境的破坏, 东海区曼氏无针乌贼的数量明显衰退, 产量急剧下降(吴常文等, 2010)。为恢复曼氏无针乌贼野

生资源, 众多研究者针对曼氏无针乌贼胚胎发生(常抗美等, 2009)、营养(符方尧等, 2005)、生理生态以及繁殖生物学(张建设等, 2011)等方面开展了比较全面的研究, 但对于该物种的 SCD 基因及其相关功能还未见报道。本文以曼氏无针乌贼为研究对象, 通过分子生物学及生物信息学手段, 探讨其 SCD 基因保守区段的基因结构和相关功能片段, 阐明其在曼氏无针乌贼中可能存在的生物学功能, 为其脂肪酸代谢研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 曼氏无针乌贼采自福建宁德养殖基地, 选择健康、有活力的乌贼活体用于实验。

1.1.2 试剂 RNAiso Plus、RNA LA PCRTM Kit (AMV) Ver1.1、TaqDNA 聚合酶、pMD18-T Vector、

* 国家自然科学基金项目, 31001109 号; 国家星火计划项目, 2012GA700111 号; 浙江省重点科技创新团队项目, 2010R50025 号; 国家科技支撑计划, 2011BAD13B08 号。马明华, 硕士研究生, E-mail: mmh20052006@163.com

通讯作者: 吴常文, 教授, E-mail: wucw08@126.com

收稿日期: 2012-09-12, 收修改稿日期: 2012-12-18

E. coli DH5 α 购自宝生物大连有限公司; SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一条链的合成

从活的成体曼氏无针乌贼中取 50—100mg 肝脏组织放入液氮速冻后立即放入 TRIZOL(Invitrogen)匀浆, 按 RNAiso Plus 说明提取总 RNA。cDNA 合成按照 RNA LA PCRTM Kit (AMV) Ver1.1 试剂盒推荐的方法进行。

1.3 曼氏无针乌贼肝脏 SCD 基因 cDNA 核心片段的克隆

根据已报道的不同物种 SCD 的氨基酸序列保守区设计曼氏无针乌贼 SCD 基因引物, 序列如下:

P1 5'GARACDGAYGCNGACCCCHCACAA 3'

P2 5'TGDGCRGCRCTGTTSACYARCCA 3'

PCR 反应 10 μ L 体系 0.5 μ L Mg²⁺ (25mmol/L), 1 μ L Buffer (10 \times), 0.5 μ L 上下游引物(10 μ mol/L), 0.3 μ L *Taq* 酶(1U/ μ L), 1 μ L dNTPs (10mmol/L), 6.2 μ L ddH₂O 下按照以下条件进行: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 52 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 35s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 12min。PCR 产物以 QIAGEN 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化后, 与 pMD18-T 载体连接, 转化至 *E. coli* 感受态细胞, PCR 检测后将阳性克隆送上海英骏公司进行测序。

1.4 SCD 基因全长 cDNA 的获得

依据前一步骤获得的 SCD cDNA 序列的核心片段及 5'RACE System 试剂盒要求, 设计 5'RACE 引物 GSP-1: 5'CAGGATCGTTGAGCAA 3', GSP-2: 5'TGCCTTTGGCTCTCACA TTAG 3', GSP-3: 5'GGAGAAG-AAGAAGCCACGTTT 3'。5'RACE 的操作按照试剂盒推荐的方法进行, 以引物 GSP-2 与试剂盒内桥连铆钉引物 AAP 对已经加 dC 尾的 cDNA 进行 PCR 第一轮扩增, 另以引物 GSP-3 和试剂盒内桥连通用扩增引物 AUAP 进行巢式 PCR 第二轮扩增。3'-RACE 上游引物 3'122-1: 5'AGTTGGTGTGGGATGAAAGTCTGTGG 3', 3'122-2: 5'GAATCTTGCGCTATTGTTGTGGCCTGA 3', 以引物 3'122-1 与 UPM, 进行第一轮 touchdown PCR 扩增; 再以引物 3'122-2 和 UPM 进行第二轮 touchdown PCR 扩增, 上述 PCR 扩增条件参考试剂盒上说明进行操作。RACE 产物纯化克隆和测序方法同 1.3 步骤。

1.5 曼氏无针乌贼 SCD 基因序列分析

采用 DNAMAN 软件对测序结果进行序列拼接和分析, 获得曼氏无针乌贼 SCD 基因的全长 cDNA 序列, 通过 SMART (<http://smart.embl->

delbe-rg.de/)翻译为多肽序列, Expasy-ProtParam 在线软件 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测分子量和等电点, 并在网站 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行同源建模。利用 ClustalX (Thompson *et al*, 1997)软件将其与已知其它动物的 SCD 基因进行同源性比对, 并以该基因作为分子标记分析曼氏无针乌贼与其它动物的亲缘关系, 采用 MEGA4.0 (Kumar *et al*, 2001; Tamura *et al*, 2007) Neighbor-joining (Saitou *et al*, 1987)法构建分子进化树。

2 结果与分析

2.1 曼氏无针乌贼 SCD 基因全长的获得

以曼氏无针乌贼肝脏 cDNA 为模板, 以 P1 和 P2 为引物扩增得到 300bp 的片段(图 1, 左), 与预期大小一致。将产物电泳回收、纯化后克隆至 pMD18-T 载体, 并送往上海英骏生物技术有限公司测序, 得到 314bp 的 cDNA 片段。根据已克隆的曼氏无针乌贼肝脏 SCD cDNA 核心片段设计引物, 进一步利用 5'RACE 和 3'RACE 技术分别获得 2 个大小分别为 700bp 和 600bp 的 PCR 产物(图 1 中、右)。

2.2 曼氏无针乌贼 SCD 基因 cDNA 全长序列特征

测序拼接确定曼氏无针乌贼 SCD cDNA 全长为 1513bp, 其中 5'非翻译区(5'UTR)为 261bp, 3'非翻译区(3'UTR)为 331bp, 开放阅读框(ORF)为 921bp, 编码 306 个氨基酸(图 2)。

2.3 曼氏无针乌贼 SCD 基因蛋白质序列比对和同源性分析

以 ClustalX 软件将曼氏无针乌贼与其它亲缘关系较近的真蛸(*Octopus vulgaris*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)、虱目鱼(*Chanos chanos*) (Hsieh *et al*, 2001)四个物种进行氨基酸序列比对, 结果发现曼氏无针乌贼与上述四个物种氨基酸序列高度保守, 同源性较强(图 3), 其中曼氏无针乌贼与真蛸和长牡蛎的相似性高达 91%, 同虱目鱼的相似性为 90%, 与鲈鱼的相似性为 89%。采用

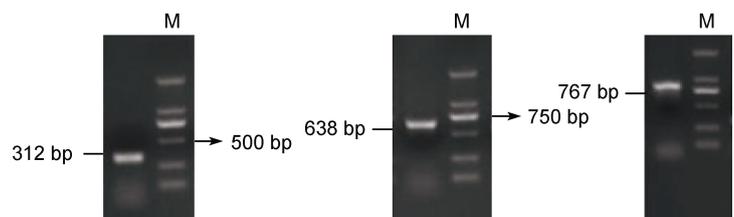


图 1 曼氏无针乌贼 SCD 基因 cDNA 的扩增

Fig.1 The amplification of SCD gene cDNA in *S. maindroni*

MEGA 4.0 将曼氏无针乌贼与真蛸(*O. vulgaris*)、长牡蛎(*C. gigas*)、原鸽(*Columba livia*)、火鸡(*Meleagris gallopavo*)、鲈鱼(*D. labrax*)、小点猫鲨(*Scyliorhinus canicula*)、虱目鱼(*C. chanos*)、绿海龟(*Chelonia mydas*)、黑猩猩(*Pan troglodytes*)、野猪(*Sus scrofa*)10 种动物及人(*Homo sapiens*)的 SCD 氨基酸序列构建系统进化树, 结果如图 4。头足类的 SCD 与牡蛎等软体动物明显位于同一进化支, 其中同属于头足类的曼氏无针乌贼和真蛸, 位于同一个分支, 证明其亲缘关系最接近。曼氏无针乌贼的 SCD 氨基酸序列与其它动物亦呈较高相似性, 说明该基因在进化上较为保守, 在各种动物中均担任脂肪酸代谢的生理功能。

2.4 曼氏无针乌贼 SCD 基因的生物信息学分析

2.4.1 理化性质分析 通过 Expasy (Gasteiger *et al*, 2003)中的 protParam 程序对 SCD 基因编码蛋白质进行了理化性质预测, 结果表明: SCD 蛋白由 306 个氨基酸组成, 为碱性蛋白质, 包括 30 个碱性氨基酸, 25 个酸性氨基酸, 原子总数为 4919, 理论分子量为 34.92kDa, pI 为 8.95; 用 SignalIP (<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP/>) (Bendtsen *et al*, 2004)预测蛋白质序列中的信号肽的剪切位点, 发现该蛋白不存在信号肽, 推测 SCD 为非分泌性蛋白, 在细胞质中合成并以可溶性状态保留在原处, 直接作用于胞液中可溶性的代谢物; 以 Tmpred 对 SCD 跨膜结构域进行预测, 结果表明: SCD 存在四个跨膜结构域, 分别为 42—64 号氨基酸、69—91 号氨基酸、188—207 号氨基酸、217—239 号氨基酸, 说明 SCD 为膜结合蛋白。SCANProsite 软件对该蛋白质可能的修饰位点进行分析, 发现有多个位点可以发生磷酸化修饰, 个别位点可以发生糖基化修饰。

```

1 ATCTTCCTTCAGCGACAAAATTTAAGGATTTTGAATTTTGA AAAAATGGATAGAACCACG
61 CATCCAACCTGGTACTGGTAAAAAACAACACTAGAAATCGAATATTATCATTAGGGTCCTC
121 ATTTTATTTATGATTAATTTATTATTGAGCGGAATTTGCTTAAAGAACTTCTCTTGAATTT
181 AAGGTTTATGCTTTACCCATAAGTTATTTCTTTTCATTTGAAAACCTGGAACAGATTTCTA
241 AGTTGGAAATCCCAGTGAAAATGCTCCACGAAATATTGTAACGGAAATACCCCCACA
1 M S P R N I V T E I T P T
301 GAGGATGATCTTCATCCTGGGGAACCTGAATGTTGAACCCGTGATCACTGAAGAACTCAT
14 E D D L H P G E L N V E P V I T E E T H
361 TTGGAAAAGAGACCACCTATGAAAATGTCTGAGAAATGTATTGCTGATGACAAATTTTA
34 L E K R P P M K I V W R N V L L M T I L
421 CACCTTGCCGCTTATATAGTCTTTCATTAATACCAGTTGCCATGTATATAACGTTAAT
54 H L A A L Y S L S L I P V A H V Y T L I
481 TGGGCTCTGGGTGTGATATCTATGCTGGTATTGGGATCACAGCTGGTGACACCGTTTG
74 W A L G V Y I Y A G I G I T A G A H R L
541 TGGGCTCACAAAGCATAAAAGCCAAATACCAGTGAAGAGCCCTTCTGGCCTCCATGCAG
94 W A H K A Y K A K L P M R A L L A S M Q
601 TCAACAGCATCCAGAAATCCATTTTTGAATGGAGCCGAGATCACAGGGTTTCATCATAAA
114 S T A F Q N S I F E W S R D H R V H H K
661 TATTCAGAAACAGATGCCGACCCCAATGCCAAAGCTGGCTTCTTCTCCCATATT
134 Y S E T D A D P H N A K R G F F F S H I
721 GGTGGTTGCTTGTCCGAAACATCCTAATGTGAGAGCCAAAGGCAAATATTAGATACA
154 G W L L V R K H P N V R A K G K L L D T
781 ACCGATTTGCTCAACGATCCTGTCGTACGGTTTCAAAGAAAATATTATATCCCATCTGTT
174 T D L L N D P V V R F Q R K Y Y I P S V
841 CTTCTCTTCTGTTCATCATCCCAACAAATGTTCCCTAGTTGGTGGTGAAGTCTG
194 L L F C F I I P T I V P S W C W D E S L
901 TGGAATGCTTACTTTCTTGTGGAATCTTGGCCTATTGTTGTGGCCTGAATGCAACTTGG
214 W N A Y F L A G I L R Y C C G L N A T W
961 CTGGTTAACAGTGTGCCACATGTGGGGTAACCGACCTTATGACAAACGGATCAACCCA
234 L V N S A A H M W G N R P Y D K R I N P
1021 GCTGAGAACATTTGGGGTTCAGCATTTGGCAGTATGGGTGAAGGTTTCCATAATTATCACCAC
254 A E N I G V S I G S M G E G F H N Y H H
1081 ACTTTCCCGAGGATTACAAGACCATTCCAAATGAGTTCGTAGCAAGTGGGATGCTAAGA
274 T F P Q D Y K T I P N E S L A S G M L R
1141 ATTACCGAGTCTCTATTGGCTTCCCATATCCTCTGTTTGAATCGTTTACCCAGAAAGGG
294 I T E S L F G F P I S V *
1201 AACAGAATCTTTACCCACTCACAGGGTTCCTTCTATTTAATAAGGAAACAAGAACA
1261 TTGTTAAATTTATGTGGTTGCCATTCTTAGCACAACTGTCACACAAGTATTTTGTCT
1321 GCTCCGGAGTTTCTTTTAGGTGTATCCACATACACAGTACGTATTCTTGGATGTGAAC
1381 ATATCTTTTGTCTTAAATACATAGATGTATATATATATATATTTATAAATATATATCTCCA
1441 TCTACATATATATATCTATTTTTTCTTAAGTAATAAAATTAACACAACAGGGAAAAAAA
1501 AAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 2 曼氏无针乌贼 SCD 基因 cDNA 全长及氨基酸序列

Fig.2 Full-length of cDNA and amino acid sequence of SCD gene in *S. maindroni*
注: 三个组氨酸盒模序用下划线表示, 起始终止密码子加框表示, 多聚腺苷酸加尾信号用双下划线表示

2.4.2 SCD 蛋白二级结构分析与三级结构预测
二级结构分析发现 SCD 蛋白含有 45.10%的螺旋, 9.48%的延伸链和 45.52%的无规则卷曲, 其中二级结构特征与已克隆出的鹅的 SCD 基因极为相近(付晓英, 2010)¹⁾, 通过同源建模构建 SCD 蛋白质三级结构图显示曼氏无针乌贼 SCD 蛋白含有四个α螺旋(图 5), 推测其可能为跨膜结构域的组成成分。

1) 付晓英, 2010. 鹅 SCD1 基因全长 cDNA 的克隆、组织表达及填饲对其表达的影响. 雅安: 四川农业大学硕士学位文, 1—52

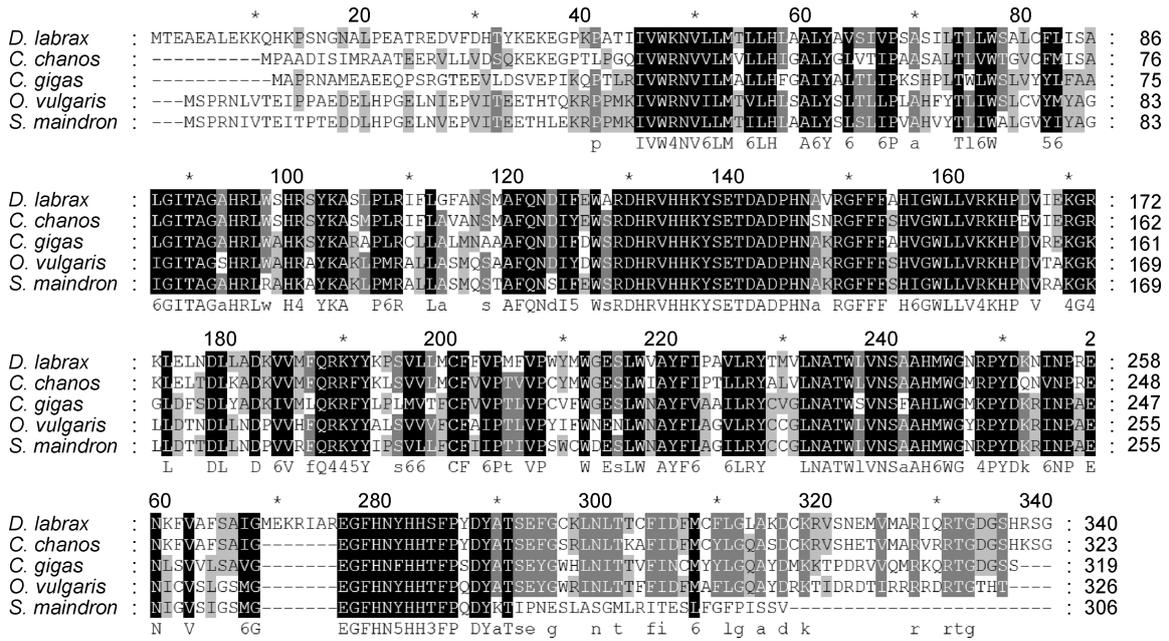


图 3 氨基酸序列比对图
Fig.3 The comparison for the amino sequences

3 讨论

硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(stearoyl-coenzyme A desaturase, SCD)是脂肪酸去饱和化的关键酶, 与作为体内能量重要来源和膜的重要组成成分的多不饱和脂肪酸(PUFA)共同维持膜流动性, 并在脂肪酸代谢中起中心调节作用(Ntambi, 1999)。本研究克隆获得曼氏无针乌贼 SCD cDNA 全长 1513bp, 其中 5'非翻译区(5'UTR)261bp, 3'非翻译区(3'UTR)331bp, 开放阅读框(ORF)921bp, 编码 306 个氨基酸, 为碱性蛋白质。预测获得的曼氏无针乌贼 SCD 蛋白序列同已报道的其它物种的 SCD 具有较高同源性, 对曼氏无针乌贼、真蛸(Monroig *et al.*, 2012)、长牡蛎的氨基酸序列进一步比对分析发现, 同源性高达 93.47%—90.12%, 说明 SCD 在软体动物中的结构相对保守, 与其它非软体动物 SCD 氨基酸同源性亦较高, 达到 50%以上, 说明 SCD 分子在进化分类上比较古老,

可能是由同一祖先进化而来。分析不同物种 SCD 基因的系统进化树可知, 曼氏无针乌贼和真蛸及长牡蛎进化关系最近, 与鱼类稍远, 与人及大鼠等哺乳动物亲缘关系最远。因此, 根据不同物种 SCD 基因序列构建的系统进化树能较真实地体现曼氏无针乌贼 SCD

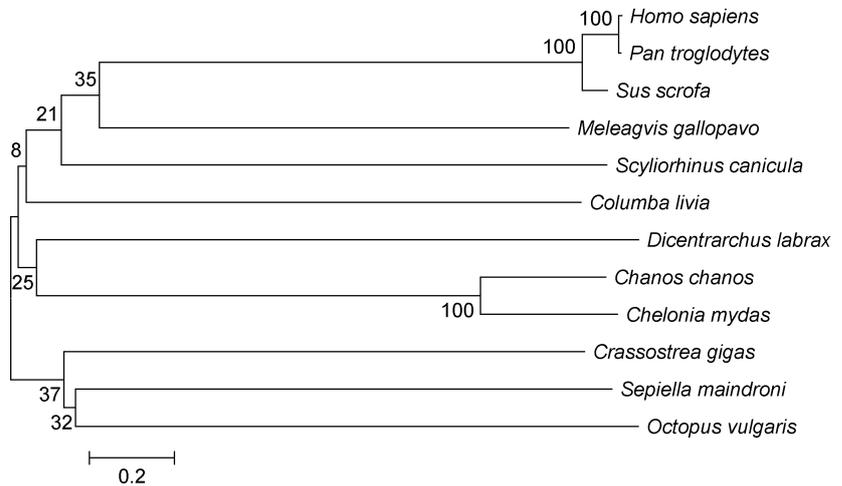


图 4 基于曼氏无针乌贼 SCD 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树
Fig.4 NJ phylogenetic tree depicting the relationship of *S. maindroni* SCD amino acids sequence with other species

1) 付晓英, 2010. 鹅 SCD1 基因全长 cDNA 的克隆、组织表达及填饲对其表达的影响. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 1—52

基因的分类地位,也反映了 SCD 基因在各物种中可能执行相近的功能,即参与脂肪酸代谢。

利用核酸、蛋白质分析软件,从分子水平对 SCD 氨基酸序列的结构特征进行分析发现,SCD 为疏水蛋白质,含有 4 个跨膜区域,从 42—91 号氨基酸残基、188—239 号氨基酸残基,各含两个跨膜区,与鹅 SCD 蛋白类似(付晓英, 2010)¹⁾,

但不同于虾夷马粪海胆 SCD 基因(三个跨膜区)(丁君等, 2012)。一般跨膜结构域包括 α -螺旋和 β -折叠,以 α -螺旋为主,固着于细胞膜上起锚定作用,曼氏无针乌贼 SCD 蛋白含有 45.10%的螺旋,可能作为膜受体发挥作用,也可能作为定位于膜的锚定蛋白或者离子通道等来起相关作用。曼氏无针乌贼 SCD 蛋白不存在剪切信号,但含有多个位点可以发生磷酸化修饰,个别位点可以发生糖基化修饰,表明该蛋白可能只存在于细胞质中发挥作用,而不分泌到细胞外,蛋白质的脱磷酸化和磷酸化在细胞信号传导中起到重要作用,SCD 蛋白中的多个磷酸化位点可能是其完成生理功能的结构基础(de Castro *et al*, 2006)。在哺乳动物、真菌、蓝细菌、昆虫及高等植物中的膜脱氢酶的一级结构中含有三个富含组氨酸盒模序的保守区域,推测是作为酶当中的铁离子配体发生作用,定点诱变技术检测发现,小鼠 $\Delta 9$ 脱氢酶的 8 个保守的组氨酸残基对于催化作用必不可少,作者的研究结果表明曼氏无针乌贼 SCD 序列和它的物种有着类似的模式,都有上述三个组氨酸盒模体的区域(图 2),推测该结构域是硬脂酰辅酶 A 去饱和酶与配体发生相互作用的重要位点。

SCD 基因是改善曼氏无针乌贼肉质的重要候选基因,其成功克隆对于深入探讨软体动物脂肪酸代谢相关基因在生物体内作用机制及调控机理具有重要意义,进而在分子水平上为曼氏无针乌贼的良种培育及人工养殖提供科学依据。

参 考 文 献

丁 君, 孙 巍, 常亚青, 2012. 虾夷马粪海胆硬脂酰辅酶 A



图 5 SCD 蛋白的三维结构模型

Fig.5 Tertiary structure model of SCD protein

- 去饱和酶和蛋白酪氨酸磷酸酶基因的克隆与表达. 上海海洋大学学报, 27(6): 489—494
- 吴常文, 董智勇, 迟长凤等, 2010. 曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)繁殖习性及其产卵场修复的研究. 海洋与湖沼, 41(1): 39—46
- 张建设, 夏灵敏, 迟长凤等, 2011. 人工养殖曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)繁殖生物学特性研究. 海洋与湖沼, 42(1): 55—59
- 栾广春, 王加启, 卜登攀等, 2007. 多不饱和脂肪酸对机体脂肪代谢基因表达调控研究进展. 中国畜牧兽医, 34 (12): 5—8
- 常抗美, 吴常文, 吕振明等, 2009. 曼氏无针乌贼胚胎发育与人工育苗技术的研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 28(3): 257—263
- 符方尧, 蒋霞敏, 柳敏海, 2005. 曼氏无针乌贼的药用价值及其人工养殖. 中国水产, 12: 26—27
- Bendtsen J D, Henrik N G, Heijine V *et al*, 2004. Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. Journal of Molecular Biology, 340(4): 783—795
- de Castro E, Sigrist C J, Gattiker A *et al*, 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in protein. Nucleic Acids Research, 34: W362—W365
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C *et al*, 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Research, 31(13): 3784—3788
- Hsieh S L, Liao W L, Kuo C M, 2001. Molecular cloning and sequence analysis of stearoyl-CoA desaturase in milkfish, *Chanos chanos*. Comparative Biochemistry and Physiology, 130(4): 467—477
- Kumar S, Tamura K, Nei M *et al*, 2001. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputer. Computer Applications in the Biosciences, 10(2): 189—191
- Monroig O, Tocher D R, Navarro J C *et al*, 2012. Isolation and functional characterisation of a stearoyl-CoA desaturase from the marine invertebrate *Octopus vulgaris*. Comparative Biochemistry and Physiology, 163(supplement): S46—S47
- Ntambi J M, 1999. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. Journal of Lipid Research, 40(9): 1549—1558
- Saitou N, Nei M, 1987. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology Evolution, 4: 406—425
- Tamura K, Dudley J, Nei M *et al*, 2007. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24: 1596—1599
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F *et al*, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25: 4876—4882

CLONING AND ANALYSIS OF THE FULL-LENGTH cDNA SEQUENCE OF *SEPIELLA MAINDRONI* SCD GENE

MA Ming-Hua, LIU Hui-Hui, CHI Chang-Feng, WU Chang-Wen

(Marine Science and Technology College of Zhejiang Ocean University, Key Laboratory of
Mariculture Equipments and Engineering Technology of Zhejiang Province, Zhoushan, 316004)

Abstract Strearyl coenzyme A desaturation enzyme is the key enzyme of fatty acid desaturation. In this paper, a 1513bp full-length cDNA of SCD gene from *Sepiella maindroni* was obtained with RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques, which consisted of a 261bp 5'untranslated region (UTR), a 921bp open reading frame (ORF), and a 349bp 3'UTR. The molecular weight of deduced protein was 34.92kDa and its pI was 8.95. The SCD protein was hydrophobic protein and contained four transmembrane regions with rich spiral structures (45.10%). The deduced amino acid sequence aligned with those of SCD genes from different species showed high degree of sequence homology. The similarity of amino acid sequence of SCD protein was 91% among *S. maindroni*, *Octopus vulgaris* and *Crassostrea gigas*, and the homology was also more than 50% between *S. maindroni* and other animals. The result indicated that the structure of SCD protein was conserved. The SCD in *S. maindroni* was clustered with *O. vulgaris* and *C. gigas*, and further grouped with fish, then fell into a neighboring branch with human, mouse and other mammals. The SCD gene was the main candidate gene for improving the meat quality of *S. maindroni*, and its cloning and related analysis were of great significance to explore mollusks fatty acid metabolism related genes in the biological and regulation mechanisms.

Key words *Sepiella maindroni*; SCD gene; cDNA; bioinformatic