

# 曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*)精子表面蛋白 17(Sp17)基因克隆以及组织表达特异性分析\*

周林<sup>1</sup> 李颖<sup>1</sup> 吕振明<sup>1</sup> 史会来<sup>2</sup> 吴常文<sup>1</sup> 迟长凤<sup>1</sup>

(1. 浙江海洋大学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 海洋生物种质发掘与利用国家地方联合实验室 舟山 316022; 2. 浙江省海洋水产研究所 舟山 316021)

**摘要** 精子表面蛋白 17(Sp17)是参与受精过程的关键分子。本研究采用 RT-PCR 以及 RACE 技术克隆得到了曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*)Sp17 简称 Sj-Sp17 cDNA 的全长序列, 序列全长 1463bp, 5'和 3'非编码区分别为 92bp 和 222bp, 预测的开放阅读框(ORF)全长 1149bp。编码的蛋白理论分子量为 42.0548kDa, 等电点 4.66, 是一种亲水性蛋白, 不存在跨膜区以及信号肽序列, 含有丰富的螺旋结构(54%)。同源氨基酸序列比对发现, 与其他软体动物的相似性最高仅为 44%, 表明 Sp17 在进化中并不保守。基于 Sp17 氨基酸序列构建的系统进化分析表明, 曼氏无针乌贼和加州双斑蛸(*Octopus bimaculoides*)进化关系最近。组织特异性分析发现 Sp17 在曼氏无针乌贼的生殖系统中均有较高的表达量, 其中在精巢和储精囊中有显著表达。Sp17 基因的成功克隆以及组织表达特异性分析对于深入研究其细胞定位以及生物学功能具有重要意义。

**关键词** 曼氏无针乌贼; Sp17; cDNA; 生物信息学; real-time PCR

**中图分类号** Q789; Q955 doi: 10.11693/hyhz20170300060

精子表面蛋白 17(Sp17)是一种最初定位于哺乳动物雄性个体生殖细胞表面的特异性自身抗原性物质, 目前已经在兔(Richardson *et al*, 1994)、鼠(Kong *et al*, 1995)、人(Lea *et al*, 1997)等物种中有过研究, 并发现在同一个物种中编码成熟 Sp17 的不同长度的 mRNA 都有相同的编码区序列, 在功能上已被证实具有结合卵膜透明带, 参与顶体反应, 以及与葡聚糖、硫酸葡聚糖等大分子结合的作用(Richardson *et al*, 1994), 是在受精过程中起关键作用的蛋白。除此之外在软体动物部分种类基因组序列中也发现了具有类似 Sp17 结构的基因。根据其自身抗原特性, 越来越多的研究表明 Sp17 除了雄性生殖系统, 在呼吸系统的纤毛细胞以及某些癌细胞组织中也有不同水平的表达(Grizzi *et al*, 2004), 因此被作为一种候选的检测

抗原而被应用于医学研究(De Jong *et al*, 2002)。

曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*)属软体动物门(Mollusca)、头足纲(Cephalopoda)、十腕目(Decapoda)、乌贼科(Sepiidae)、无针乌贼属(*Sepiella*)。作为一种具有较高药用、食用价值的经济头足类, 自 20 世纪 80 年代以来自然种群数量急剧下降(吴常文等, 2010), 众多学者对于其资源保护以及生殖发育进行了研究(李星颀等, 1986; 张建设等, 2011)。在本实验中, 我们首次克隆了编码曼氏无针乌贼 Sp17(定义为 Sj-Sp17)的 cDNA 全长序列, 结合生物信息学分析探讨了 Sj-Sp17 基因以及蛋白结构与其可能存在的生物学功能的关系, 并通过 real-time PCR 技术分析了编码该蛋白的 mRNA 在不同组织中的表达特异性, 为进一步研究 Sj-Sp17 的细胞定位以及蛋白的生物学功

\* 科技部港澳台科技合作专项, 2014DFT30120 号; 浙江省自然科学基金项目, LY15C190010 号; 舟山市科技专项, 2016C41016 号; 浙江省科研院所专项, 2015F50055 号; 浙江海洋大学“海洋科学”省重中之重学科开放课题, 20160116 号。周林, 硕士研究生, E-mail: 1527074150@qq.com

通讯作者: 迟长凤, 博士, 教授, E-mail: chicf@zjou.edu.cn

收稿日期: 2017-03-17, 收修改稿日期: 2017-04-15

能奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 性成熟的曼氏无针乌贼雄性个体取自浙江温州苍南头足类种苗繁育基地, 活体解剖取精巢、储精囊、输精管、前列腺、精荚、胃、肠、肝、鳃、视叶、脑、心脏、胰、肌肉共 14 种组织样品保存于 RNAstore 中, 以干冰装运至实验室, 放置于-80 冰箱保存备用。

**1.1.2 试剂** RNAstore 购自 CWBIO 公司; RNAiso Plus、PCR Master Mix、Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-), SYBR Premix Ex Taq™ II Kit、SMART™ RACE kit 均购自 TaKaRa 公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 总 RNA 提取以及 cDNA 第一链的合成** 取保存于 RNAstore 中的新鲜精巢组织 50—100mg, 根据 RNAiso Plus 试剂说明书提取总 RNA。cDNA 的合成按照 M-MLV (RNase H-)反转录试剂盒推荐的方法进行。

**1.2.2 曼氏无针乌贼 Sp17 基因核心片段的克隆** 根据已有的转录组数据, 筛选并设计用于克隆 Sj-Sp17 基因核心片段的引物, 序列如下:

表 1 克隆 Sp17 基因所用引物  
Tab.1 Primers used in Sp17 gene clone

引物名称	序列(5'—3')
SP17-1F	AGCAGATGTTAGCCCTTT
SP17-1R	CTTCAGTATCTTTGGTGCTT
SP17-2F	TCTTCTAGAGGGTTTCGC
SP17-2R	TGCAGGAGCTTTTACTTC
SP17-3F	ACTAAAAGTCTGAAGAG
SP17-3R	TGTAGCAGCAGCACTGACCT

PCR 25μL 体系根据 PCR Master Mix 试剂说明书进行加样, 反应条件为: 94 预变性 5min; 94 30s, 58 30s, 72 30s, 35 个循环; 72 延伸 7min, 12 5min 结束。PCR 产物经过 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测, 含有目的片段的 PCR 产物送至上海华大生物公司进行测序。

**1.2.3 Sp17 基因全长 cDNA 的克隆** 根据上一步所得到的 Sj-Sp17 基因核心序列, 参考 SMART™ RACE 试剂盒的要求设计 5'和 3'RACE 引物, 见表 2。

5'RACE 采用引物 SP17-5'Outer 和试剂盒接头引物 5'adapter 以加尾的 cDNA 为模板进行第一轮 PCR

表 2 Sp17 基因 RACE 使用引物  
Tab.2 Primers used in RACE of Sp17 gene

引物名称	序列(5'—3')
SP17-5'Outer	GCTCCGAAGTGAATGA
SP17-5'Inner	TTTTGGCTGAGCCCGTAG
SP17-3'Outer	AGCAAGATCCAGGCAAGTTTATAGAGGTCA
SP17-3'Inner	ATGCTATCGACATTGACCTAACTGACCCA

扩增, 然后以 SP17-5'Inner 引物和 5'adapter 进行巢式 PCR 第二轮扩增。3'RACE 采用引物 SP17-3'Outer 和接头引物 3'adapter 进行第一轮 PCR 扩增, 接着以引物 SP17-3'Inner 和 3'adapter 进行巢式 PCR 二轮扩增。PCR 条件参考试剂盒说明书。PCR 产物电泳检测并纯化回收, 连接到 PMD18-T 载体, 后转化至 DH5α 感受态细胞培养, 挑取阳性克隆送至上海华大生物公司测序。

**1.2.4 曼氏无针乌贼 Sp17 基因全长及序列分析** 将测序得到的片段通过 DNAMAN 软件进行拼接, 并用 ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 在线工具预测基因的开放阅读框(ORF)位置; 然后利用 Expasy-ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger *et al*, 2003)将其翻译为氨基酸序列并预测蛋白的相对分子量和等电点; 应用在线工具 SignalIP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP/>) (Bendtsen *et al*, 2004)以及 TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分别对其进行信号肽以及跨膜区的预测; NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)软件分析其磷酸化位点; 保守结构域分析采用 NCBI 在线搜索工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>); Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Thompson *et al*, 1997)对 Sj-Sp17 及其同源氨基酸序列进行比对, 基于 Sp17 氨基酸序列分析不同物种之间的进化关系并利用贝叶斯法构建分子进化树。

**1.2.5 曼氏无针乌贼精子表面蛋白 Sp17 的组织表达特异性分析** 根据已知的 Sj-Sp17 基因全长, 在 ORF 区内设计用于 real-time PCR 的引物, 选择曼氏无针乌贼 β-actin 基因(*S. japonica* JN564496.1)作为内参基因, 合成的引物经普通 PCR 验证, 序列见表 3。

表 3 Sj-Sp17 荧光定量引物  
Tab.3 Primers of Sj-Sp17 used in real-time PCR

引物名称	序列(5'—3')
SP17-YF	TCATTCAGTTCGGAGCCA
SP17-YR	CCTATCTTCCAAATCAGCACA
Actin-F	TGAGAGGGAGATTGTGCGTG
Actin-R	GAACATAGATTCTGGAGCACGG

各组织的 RNA 提取以及合成 cDNA 第一链的方法, 如实验方法中 1.2.1 节所述。反转录后的 cDNA 利用核酸蛋白检测仪测定浓度, 并取足量稀释到 100ng/ $\mu$ L 备用, real-time PCR 加样体系及反应条件按照 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II Kit 产品说明书进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 曼氏无针乌贼 Sp17 基因全长的获得

以曼氏无针乌贼精巢 cDNA 为模板, 以 SP17-1F/1R、SP17-2F/2R 和 SP17-3F/3R 为引物扩增分别得到

338bp、256bp 和 336bp 的核心片段, 拼接后根据该基因序列设计 RACE 引物, 采用 5'RACE 和 3'RACE 方法分别获得了 210bp 和 563bp 的两个目的片段(图 1)。

**2.2 曼氏无针乌贼 Sp17 基因 cDNA 全长的序列特征**  
利用 DNAMAN 软件将扩增得到的长度分别为 338bp、256bp 和 336bp 的核心片段以及 3'RACE 和 5'RACE 长度分别为 210bp 和 563bp 的片段拼接得到 S<sub>j</sub>-Sp17 基因全长 cDNA 1463bp, 预测 ORF 为 1149bp, 5'UTR 区 92bp, 3'UTR 区 222bp, 共编码 382 个氨基酸(图 2)。

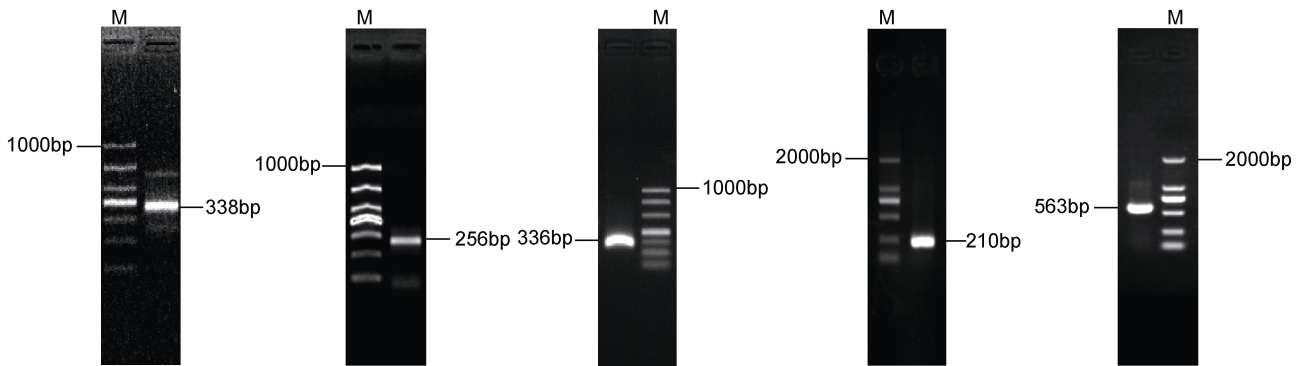


图 1 曼氏无针乌贼 Sp17 基因 cDNA 的扩增  
Fig.1 The amplification of Sp17 gene cDNA in *S. japonica*

### 2.3 曼氏无针乌贼 Sp17 氨基酸序列比对以及同源性分析

选来自 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库的 Sp17 同源性序列与 S<sub>j</sub>-Sp17 进行氨基酸比对, 发现组成该蛋白的氨基酸序列中前 100 个氨基酸比较保守。图 3 中列出部分氨基酸序列的比对结果, S<sub>j</sub>-Sp17 氨基酸序列和太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas* XP\_011412976.1)、海蜗牛(*Aplysia californica* XP\_012936202.1)、加州双斑蛸(*Octopus bimaculoides* XP\_014778086.1)、光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata* XP\_013090015.1)、紫海胆(*Strongylocentrotus purpuratus* XP\_011680588.1)以及囊舌虫(*Saccoglossus kowalevskii* XP\_006818979.1)的相似性分别为 36%、36%、36%、31%、44%和 38%。保守结构域的分析发现在不同物种的 Sp17 氨基酸序列中同一位置(12—50aa)均存在 DD CABYR SP17 结构域, 此外还存在至少一个 IQ 结构域(图 4)。采用 mrBayes 软件(Ronquist *et al*, 2003)对曼氏无针乌贼和来自于 NCBI 数据库的 65 条氨基酸序列构建系统进化树(图 5)。其中曼氏无针乌贼和加州双斑蛸位于同一进化支,

证明其亲缘关系最近, 头足类和其他软体动物例如太平洋牡蛎、海蜗牛、紫海胆等位于同一较大进化支。

### 2.4 曼氏无针乌贼 Sp17 基因的生物信息学分析

分析表明, S<sub>j</sub>-Sp17 基因编码的蛋白质包括 320 个亲水性氨基酸和 54 个疏水性氨基酸, 为亲水性蛋白。理论分子量(MW)为 42.0548kDa, 等电点(pI)4.66。信号肽和跨膜区预测结果显示该蛋白无跨膜区(图 6)以及信号肽结构(图 7)。磷酸化位点分析表明, 该蛋白存在 45 个可能发生磷酸化修饰的位点。采用 Anthept5.0 软件(Geourjon *et al*, 1991)对 SP17 蛋白的二级结构分析发现, 该蛋白含有 54%的螺旋(Helix), 3%的折叠(Sheet), 6%的转角(Turn)以及 38%的无规则卷曲结构(Coil)(图 8)。

### 2.5 曼氏无针乌贼 Sp17 组织表达特异性分析

通过 real-time PCR 的方法对 S<sub>j</sub>-Sp17 基因在精巢、脑、储精囊等共 14 种组织中的表达特异性进行分析, 以曼氏无针乌贼  $\beta$ -actin 基因(*S. japonica* JN564496.1)作为内参基因, 选取肌肉中的表达量作为参照, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算相对表达量, 并用 SPSS18 软件进行显著性分析。实验结果表明, S<sub>j</sub>-Sp17

```

1      TGTGACCCGGAGACTGTCGAGCACGGAATAACACGCTGACCTTGCTATTGAACTAAAGG
61     ACAAAGTTAATCTTCGTTTTGTAAGTTAATCATGCTGTACCCCTTTTCAAACACAAAAGT
1      M S V P F S N T K
121    TGAGGGTACCCAGAGGTTTTGAGGCTCTTCTAGAGGGTTTTGCTCGTGAAGTTCTACGGG
10     L R V P R G F E A L L E G F A R E V L R
181    CTCAGCCAAAATGTATCATTTCAGTTTCGGAGCCATGCATTTCTCCAATCTTCTCAAGATT
30     A Q P K C I I Q F G A M H F S N L L K I
241    GAACAGAAACAGGCCAAGATCCTGTTGAAGAGTGTGCTGATTGGAAGATAGGTTCTATA
50     R T E T G Q D P V E E C A D L E D R F Y
301    ACAATGATTCATTCAAGCATGAAGCTCAAGCAGATGTTAGCCCTTTTGTGCGAGACAC
70     N N D S F K H E A Q A D V S P F V A E T
361    AGATGGAAGCTCATGCCAGTGAAGAAGTAAAGCTCCTGCGAAGAGAAAAGTGAATGATA
90     Q M E A H A S E E V K A P A E E K V T D
421    ATGCTCAAGAGGAAATTTCCAGTCAAGTGCAGTCAAAAATGATGAAAATATTTCTAGTGTG
110    N A Q E E I S P S D V T N D E N I S D A
481    CTACAAAGATTCAAGCTGGGTTTAAAGGATACAAAGTTTCGAAAAGAAATGAAAAGACGCA
130    A T K I Q A G F K G Y K V R K E M K E R
541    AGACTGAACATTTCTGAAGAGAAAACGACTGCAGGTACTATAGAAGATGCTGAAAGCACAA
150    K T E H S E E K T T A G T I E D A E G T
601    AAGATGCTGAAGGCACATAAACTGCTGAAGAGGCTGCAAAATGCTGAAAGCACCAAAGATA
170    K D A E G T K T A E E A A N A E S T K D
661    CTGAAGAGGTTAAAAATGCAGAAAGACACTGGAGATGCAGCAGATAATACAAAAGAACAG
190    T E E V K N A E D T G D A A D N T K E Q
721    AAATACCCAATGAAGAGGTTATAGATATTGACCTCAATGACCCAGAAGTGGCAAACGCTG
210    E I P N E E V I D I D L N D P E V A N A
781    CTAGCAAGATCCAGGCAAGTTTTAGAGGCTATAAAAACAGGAGAGATCTGCTTAGTAAGC
230    A S K I Q A S P R G H K T R R D L L S K
841    AACAAATCAGAACATCTAGAAAATGAAAAGATGCTAACACAGTGCATTTACAGAAGACA
250    Q Q S E H L E N E K D A N N S A I T E D
901    ATGCTATCGACATTGACCTAACTGACCCAGAGGTCAGTGTCTGCTACAAAATTTCAAG
270    N A I D I D L T D P E V S A A A T K I Q
961    CAATTTTTCTGGTTCATCAGATCAGGCAAAAACCTTAAAGACACTCCTAAGGATCCAGCAA
290    A I F R G H Q I R Q K L K D T P K D P A
1021   GTGAGAAAACCATGCTCAAAAATCTGATAGTGCCACACCTGTTCAAGATGCTTAGTGTG
310   S E K T M S Q K S D S A T P V Q D A T G
1081   ACCAGGACAGGAGGATGACAAGTCTATCAACTATGAGGATCCACAGTCCAACTGGCTG
330   D Q G Q E D D K S I N Y E D P Q V Q L A
1141   CCACTAAAATCCAAGCTGGCTTTAAAGGCTACCAAACCCGCAAGAGCCATAAAGAACGCAAG
350   A T K I Q A G F K G Y Q T R K S L K K Q
1201   CTGGGAATTCAGAGGATCTTGAAGAGCAGTGGATCTTAAACAAGTTGGTGGATGAAAAC
370   A G N S E D L E K D S G S *
1261   AGATGGTGTCTTGATGGAAGAATCCTCTGTTCTCAGTAAAGCTGATAAAAATTTATTGTT
1321   CTGATATAATTTATTGATTGATAAAAATAACTCTGGCTCTATTCTTATTGGCTTTCTCCC
1381   CCTTCATACTAAGGGAATGTTCTGGCAAAGATAAAATTTCTTATTTCTTTAGCAAAAAA
1441   AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 2 S<sub>j</sub>-Sp17 基因 cDNA 全长

Fig.2 The full length of S<sub>j</sub>-Sp17 cDNA

注: 预测的开放阅读框中起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)用黑色线框标示出, 翻译出的氨基酸序列在核苷酸序列下方给出

• <i>S. japonica</i>	MSVVPF SNTKLRV ERGFEALLEGFAREVLRAQPKCTIQEFGAMHESNLLKIR	50
<i>O. bimaculoides</i>	MSVVPF SNTKLRV LGEFALLEGFAREVLRSQPQSTVQFGAMFTNLLKLR	50
<i>B. glabrata</i>	MAVVPF SNTKLRV EKGFQNLLEAFAREVLRSPENIHEFAAAAFENMMKVR	50
<i>A. californica</i>	MAVVPF SNTKLRV ENGFEQNLLECLAREVLRSPDNHEFAAAAFENMMKVR	50
<i>C. gigas</i>	MAVVPF SNTKLRV EKGFQNLLEGLARECLRSQPENIYEFGAKYFQQLIQVR	50
<i>S. kowalevskii</i>	MSVVPF SNTKLRV ERGFEQNLLEGLAREVLRTPQPDNIYFSAKVFDLLRIR	50
<i>S. purpuratus</i>	MAVVPF SNTKLRV ERGFEQNLLEGLAREVLRNQPDNLYAFSAIYEDNLLKMR	50
<i>S. japonica</i>	TETGQDPEVEECADLEDRFYNNDSFKHEAQADVSPFVAETQMEAHASEEVK	100
<i>O. bimaculoides</i>	KETGHDPEVATSALTDROYNTDLIPQVSSDT.....	82
<i>B. glabrata</i>	TETGHDPAVHGAKLDDRNYNNEGKRRKPG. AGTDQQQNN.....	88
<i>A. californica</i>	AETGHDPAVHGAKLDDRNYNNEAKKRSV. DPSDPQONS.....	88
<i>C. gigas</i>	EQTGHDPAVHGAKLEDRFYNNDSFKQSPST. DPGDPQQQE.....	88
<i>S. kowalevskii</i>	EEEGIDPAEFCAKLDQDRYNNKAKQD. NIGDYNDPQQQE.....	88
<i>S. purpuratus</i>	DQQGTDPAADIARHEDRYNNKAKQNGNVGLVSDPQQQE.....	89

图 3 Sp17 氨基酸同源比对

Fig.3 Multiple alignments of deduced amino acid sequences of Sp17

注: 相同氨基酸残基用黑色标出, 保守氨基酸残基用灰色标出

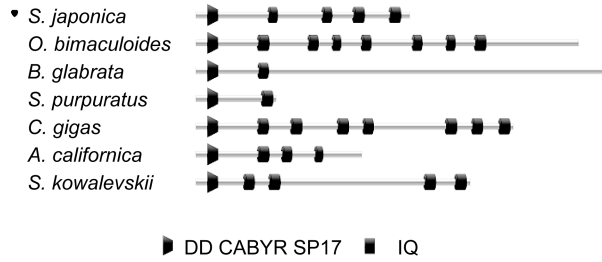


图 4 Sp17 结构域比对  
Fig.4 Comparison in protein domains of Sp17

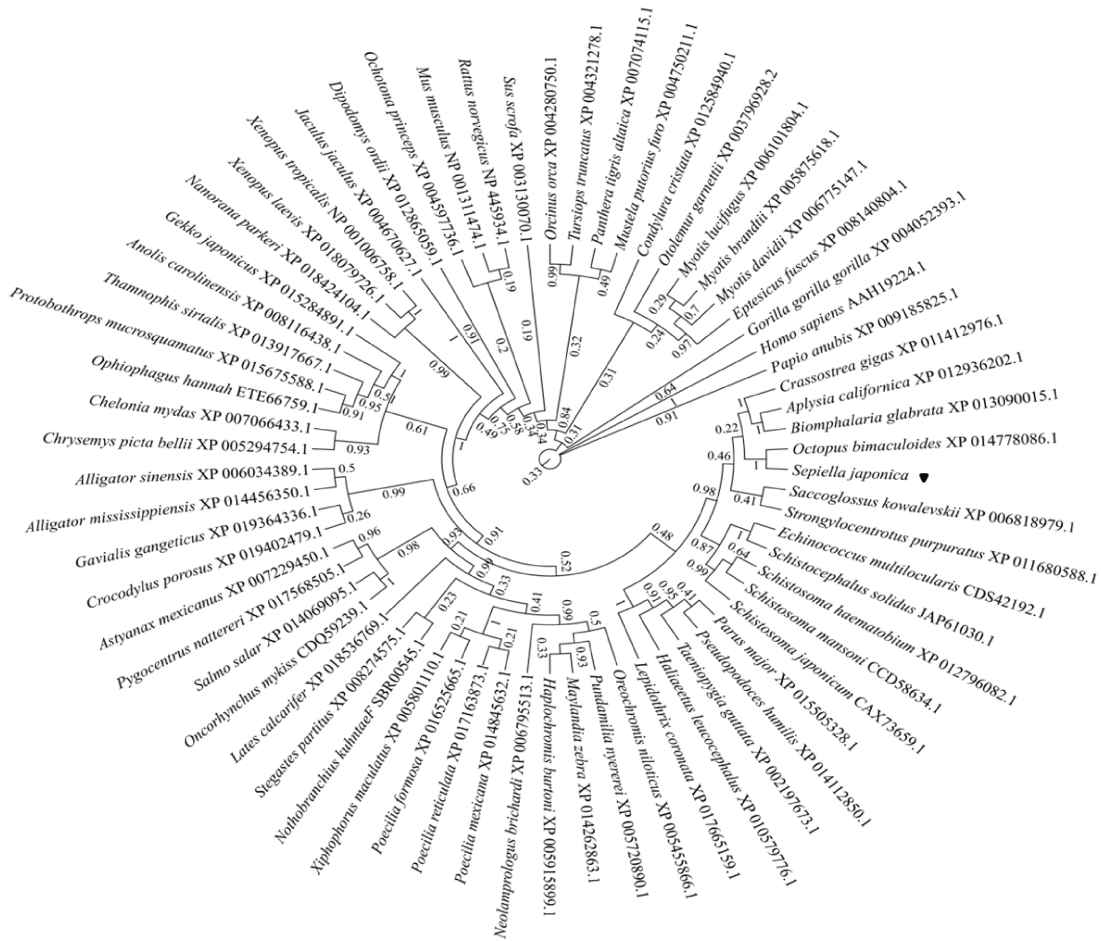


图 5 基于 Sp17 氨基酸序列构建的贝叶斯系统进化树  
Fig.5 Bayesian phylogenetic tree depicting the relationship of Sp17 amino acids sequence with other species

基因在性成熟时期的精巢、储精囊中均有显著表达 ( $P < 0.05$ ), 其次在脑、精英以及输精管中也有一定的表达, 而在其他组织中表达量极低(图 9)。

### 3 讨论

精子表面蛋白 Sp17 是一种高度保守的哺乳动物蛋白, 可能作为结合透明带表面糖基的分子而参与到顶体反应中, 并促进受精作用(Kong *et al.*, 1995;

Adoyo *et al.*, 1997)。克隆得到的 1463bp 的 Sj-Sp17cDNA 序列, 对其开放阅读框编码的氨基酸分析发现没有跨膜结构, 不存在信号肽, 因此 Sp17 不属于细胞内分泌蛋白。磷酸化位点分析表明, 其氨基酸序列中存在多个潜在的磷酸化的位点, 蛋白质的磷酸化在细胞信号转导中起重要作用(De Castro *et al.*, 2006), 因此我们推测这些磷酸化位点可能是其潜在的完成生理功能的结构基础。保守结构域

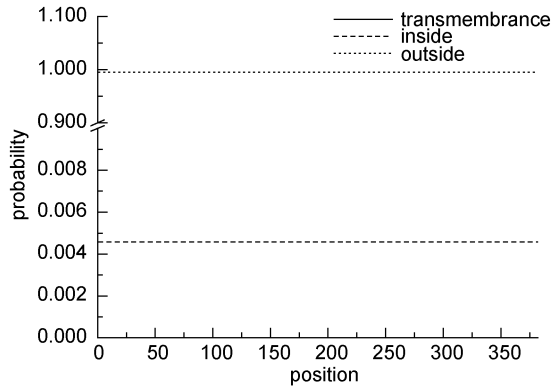


图 6 Sj-Sp17 跨膜区预测结果

Fig.6 The transmembrane region prediction of Sj-Sp17

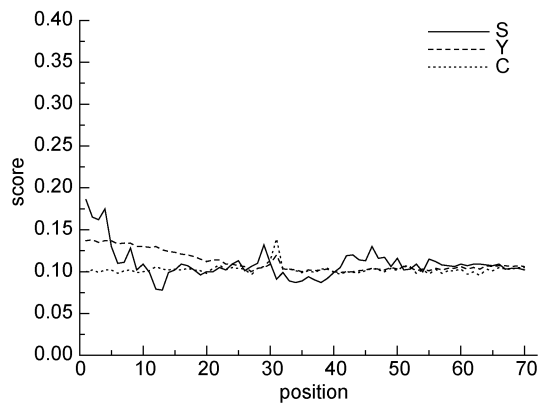


图 7 Sj-Sp17 信号肽预测结果

Fig.7 The signal peptide prediction of Sj-Sp17

分析表明 Sj-Sp17 及其同源蛋白结构中均含有一个 DD CABYR SP17 结构域以及多个 IQ 结构域(Cheney *et al*, 1992)。DD CABYR SP17 结构域是一个同时存在于 CABYR 以及 Sp17 N 端的结构, 它和依赖于

cAMP 的蛋白激酶 A 的 R 亚基(PKA RII)氨基酸序列高度相似(Frayne *et al*, 2002), 这一部分结构是形成蛋白二聚化以及与蛋白激酶 A 锚定蛋白(AKAPs)相互作用所必需的(Taylor *et al*, 1990), 并且已有实验证明 Sp17 能够亲和 AKAP3 (Lea *et al*, 2004); IQ 结构域含有保守的异亮氨酸以及谷氨酰胺残基, 属于钙调素结合蛋白家族, 钙调素结合蛋白在精子细胞中有大量的表达(Jones *et al*, 1978), 同时也被证实例如精子发生(Moriya *et al*, 1993)、精子运动(Tash, 1989)、精子获能(Adeoya-Osiguwa *et al*, 1996)、顶体反应(Zaneveld *et al*, 1991)和精卵融合(Courtot *et al*, 1994)过程中发挥调节作用, 因此我们推测 Sp17 作用机理与其他同家族蛋白类似(Wasco *et al*, 1989; Manjunath *et al*, 1993; Trejo *et al*, 1997), 即在钙离子或者 EDTA 存在下结合钙调蛋白发挥生物学作用。Sp17 中 IQ 结构域还可能与蛋白质磷酸化以及参与钙离子信号转导以调节 Sp17 蛋白与透明带表面糖基的结合有关(Deloulme *et al*, 1997)。二级结构预测显示 Sj-Sp17 氨基酸中 IQ 结构域部分含有丰富的  $\alpha$ -螺旋结构, 钙调蛋白在稳定这一结构的过程中可能起着很重要的作用(Xie *et al*, 1994; Gerendasy *et al*, 1995), 而且螺旋结构越丰富, 此区域与钙调蛋白的亲合力也越大(阎虎生等, 1991)。PEST (PEST-FIND Score=11.38)序列是一段含有丰富的脯氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸组成的短序列, 与泛素化降解有关(Rechsteiner *et al*, 1996), Sj-Sp17 氨基酸序列中 317—337aa 存在潜在的 PEST 序列, 在 Sp17 以及其他含有钙调蛋白结合域(IQ)的蛋白质中均存在这样的结构(Barnes *et al*,

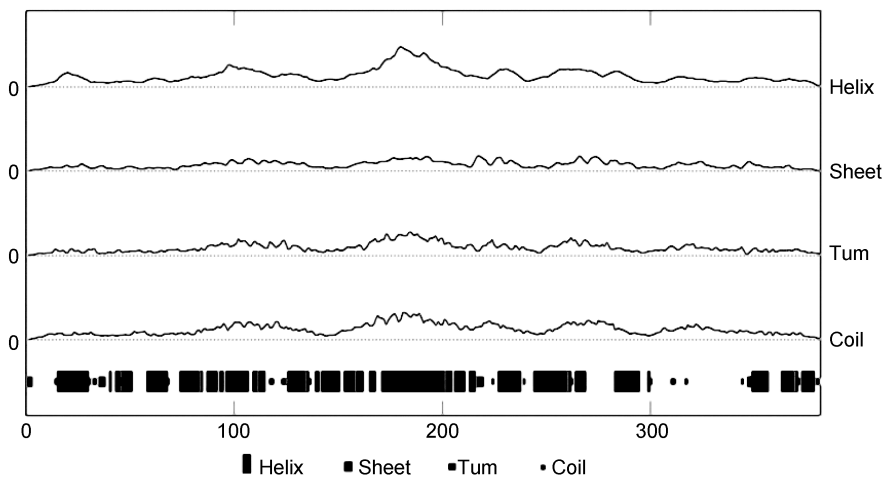


图 8 Sj-Sp17 蛋白的二级结构预测

Fig.8 The secondary structure prediction of Sj-Sp17

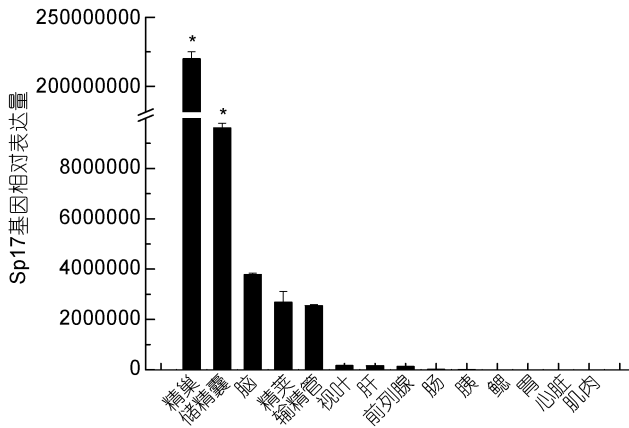


图9 Sj-Sp17 基因在不同组织的表达特异性

Fig.9 Distribution of Sj-Sp17 mRNA in various tissues

注: 数据为 3 个重复的平均值±标准误。“\*”标注表示有显著差异 ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ )

1995), 实验证实顶体反应开始后 Sp17 蛋白表达量迅速增多(Richardson *et al*, 1994), 随着反应进行, 分子量较大的三联体蛋白逐渐减少, 小分子量蛋白增加, 因此, 该 PEST 序列可能与顶体反应中高分子量的 Sp17 蛋白剪切掉 C 端的部分序列以及钙调素结合位点而最终呈现出小分子量的蛋白增加有关。

通过 Sp17 基因的组织表达特异性分析发现, 它在雄性生殖系统各组织中的表达量较其它组织更高, 尤其是在精巢中的表达量最高, 推测它可能与精子形成过程有关。通过对 Sj-Sp17 氨基酸序列及同源氨基酸序列的进化分析发现, 它与加州双斑蛸进化关系最近, 其次是太平洋牡蛎、海蜗牛、紫海胆以及扁形动物门的生物, 与人以及狒狒的关系最远。通过对进化关系较近的物种 Sp17 氨基酸序列比对发现, 同源性最高仅为 44%, 说明 Sp17 在进化中并不保守。

#### 4 结论

本文通过 RT-PCR 以及 RACE 技术克隆得到了 1463bp 的 Sj-Sp17cDNA 全长序列, 并对其编码的长度为 382 个氨基酸的蛋白质进行了一系列生物信息学分析, 发现该蛋白不含信号肽以及跨膜区结构, 氨基酸同源性最高仅为 44%, 说明 Sp17 在进化中并不是很保守。进化分析表明 Sj-Sp17 与加州双斑蛸进化关系最近。通过对预测蛋白结构的分析结合前人的研究成果, 我们推测 Sj-Sp17 可能也参与顶体反应并促进顶体反应的顺利进行, 而组织特异性分析也显示 Sj-Sp17 在精巢以及储精囊中有显著表达, 因此 Sj-Sp17 还可能与精子的形成以及成熟有关。Sj-Sp17

作为一种重要的与生殖相关的蛋白, 其成功的克隆以及组织表达特异性分析对于深入研究其生理功能以及作用机理具有重要意义, 并为曼氏无针乌贼的种质保护以及育种繁殖研究提供一定的理论依据。

#### 参 考 文 献

- 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
- 李星颢, 戴健寿, 唐志跃, 1986. 曼氏无针乌贼怀卵量及生殖力. 浙江水产学院学报, (2): 1—8
- 阎虎生, 何炳林, 1991. 多肽的  $\alpha$  螺旋结构对多肽与钙调蛋白亲合力的影响. 中国生物化学与分子生物学报, 7(2): 147—152
- Adeoya-Osiguwa S A, Fraser L R, 1996. Evidence for  $Ca^{2+}$ -dependent ATPase activity, stimulated by decapacitation factor and calmodulin, in mouse sperm. *Molecular Reproduction & Development*, 44(1): 111—120
- Adoyo P A, Lea I A, Richardson R T *et al*, 1997. Sequence and characterization of the sperm protein Sp17 from the baboon. *Molecular Reproduction and Development*, 47(1): 66—71
- Barnes J A, Gomes A V, 1995. Pest sequences in calmodulin-binding proteins. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 149—150(1): 17—27
- Bendtsen J D, Nielsen H, Von Heijne G *et al*, 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 340(4): 783—795
- Cheney R E, Mooseker M S, 1992. Unconventional myosins. *Current Opinion in Cell Biology*, 4(1): 27—35
- Courtot A M J, Feinberg J M, Schoevaert D A *et al*, 1994. Calmodulin during human sperm incorporation into hamster oocyte: an immunogold electron microscope study. *Molecular Reproduction and Development*, 38(2): 170—177
- De Castro E, Sigrist C J A, Gattiker A *et al*, 2006. Scanprosite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Research*, 34(S2): W362—W365
- De Jong A, Buchli R, Robbins D, 2002. Characterization of sperm protein 17 in human somatic and neoplastic tissue. *Cancer Letters*, 186(2): 201—209
- Deloulme J C, Prichard L, Delattre O *et al*, 1997. The proto-oncoprotein EWS binds calmodulin and is phosphorylated by protein kinase C through an IQ domain. *Journal of Biological Chemistry*, 272(43): 27369—27377
- Frayne J, Hall L, 2002. A re-evaluation of sperm protein 17 (Sp17) indicates a regulatory role in an A-kinase anchoring protein complex, rather than a unique role in sperm-zona pellucida binding. *Reproduction*, 124(6): 767—774
- 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
- Geourjon C, Deléage G, Roux B, 1991. Antheprot: an interactive graphics software for analyzing protein structures from sequences. *Journal of Molecular Graphics*, 9(3): 188—190

- Gerendasy D D, Herron S R, Jennings P A *et al*, 1995. Calmodulin stabilizes an amphiphilic  $\alpha$ -helix within Rc3/Neurogranin and Gap-43/Neuromodulin only when  $\text{Ca}^{2+}$  is absent. *Journal of Biological Chemistry*, 270(12): 6741—6750
- Grizzi F, Chiriva-internati M, Franceschini B *et al*, 2004. Sperm protein 17 is expressed in human somatic ciliated epithelia. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52(4): 549—554
- Jones H P, Bradford M M, McRorie R A *et al*, 1978. High levels of a calcium-dependent modulator protein in spermatozoa and its similarity to brain modulator protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 82(4): 1264—1272
- Kong M, Richardson R T, Widgren E E *et al*, 1995. Sequence and localization of the mouse sperm autoantigenic protein, Sp17. *Biology of Reproduction*, 53(3): 579—590
- Lea I A, Adoyo P, O'Rand M G, 1997. Autoimmunogenicity of the human sperm protein Sp17 in vasectomized men and identification of linear B cell epitopes. *Fertility and Sterility*, 67(2): 355—361
- Lea I A, Widgren E E, O'Rand M G, 2004. Association of sperm protein 17 with a-kinase anchoring protein 3 in flagella. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2: 57
- Manjunath P, Chandonnet L, Baillargeon L *et al*, 1993. Calmodulin-binding proteins in bovine semen. *Journal of the Society for Reproduction and Fertility*, 97(1): 75—81
- Moriya M, Katagiri C, Yagi K, 1993. Immuno-electron microscopic localization of calmodulin and calmodulin-binding proteins in the mouse germ cells during spermatogenesis and maturation. *Cell and Tissue Research*, 271(3): 441—451
- Rechsteiner M, Rogers S W, 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(7): 267—271
- Richardson R T, Yamasaki N, O'Rand M G, 1994. Sequence of a rabbit sperm zona pellucida binding protein and localization during the acrosome reaction. *Developmental Biology*, 165(2): 688—701
- Ronquist F, Huelsenbeck J P, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12): 1572—1574
- Tash J S, 1989. Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 14(3): 332—339
- Taylor S S, Buechler J A, Yonemoto W, 1990. Camp-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 59(1): 971—1005
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F *et al*, 1997. The Clustal\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24): 4876—4882
- Trejo R, Delhumeau G, 1997. Calmodulin content,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent calmodulin binding proteins, and testis growth: identification of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent calmodulin binding proteins in primary spermatocytes. *Molecular Reproduction & Development*, 48(1): 127—136
- Wasco W M, Kincaid R L, Orr G A, 1989. Identification and characterization of calmodulin-binding proteins in mammalian sperm flagella. *Journal of Biological Chemistry*, 264(9): 5104—5111
- Xie X, Harrison D H, Schlichting I *et al*, 1994. Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2.8 Å resolution. *Nature*, 368(6469): 306—312
- Zaneveld L J, De Jonge C J, Anderson R A *et al*, 1991. Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human Reproduction*, 6(9): 1265—1274

## MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF SPERM SURFACE PROTEIN 17 (SP17) GENE IN *SEPIELLA JAPONICA*

ZHOU Lin<sup>1</sup>, LI Ying<sup>1</sup>, LÜ Zhen-Ming<sup>1</sup>, SHI Hui-Lai<sup>2</sup>, WU Chang-Wen<sup>1</sup>, CHI Chang-Feng<sup>1</sup>

(1. National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, National and Provincial Joint Laboratory of Exploration and Utilization of Marine Aquatic Genetic Resources, School of Marine Science and Technology, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, Zhoushan 316021, China)

**Abstract** Sperm surface protein 17 (Sp17) is a key molecular in fertilization process. A 1463bp full-length cDNA of Sp17 gene from *Sepiella japonica* described as Sj-Sp17 was obtained with RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques. Sp17 consists of a 92bp 5' untranslated region (UTR) and a 222bp 3' UTR. The predicted open reading frame (ORF) is 1149bp, the molecular weight of deduced protein is 42.0548kDa, and its *pI* is 4.66. Sj-Sp17 is hydrophilic, has no signal peptide sequence and transmembrane regions, but contains rich spiral structures (54%). The deduced amino acid sequence that is aligned with other species Sp17 shows low similarity (<44%), indicating that the structure of Sj-Sp17 is not conserved. Phylogenetic analysis based on Sp17 demonstrates that *S. japonica* is closely related with *Octopus bimaculoides*. Sj-Sp17 gene was mainly expressed in reproductive system by real-time PCR analysis, and had significant expression especially in testis and seminal vesicle. We believe that cloning and analysis on tissue-specific expression of Sj-Sp17 gene would be of great significance for understanding its cellular localization and biological function.

**Key words** *Sepiella japonica*; Sp17; cDNA; bioinformatics; real-time PCR