

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)蛋白二硫键异构酶基因的分子克隆与表达分析*

曾祥兰 刘元婧 曾 慧 黄辉洋 叶海辉 王桂忠

(厦门大学海洋与地球学院 厦门 361005)

摘要 蛋白二硫键异构酶(PDI)是内质网中的关键酶,参与蛋白合成过程中二硫键的形成、还原和异构。本文首次从拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)克隆获得了 PDI 基因 cDNA 全长,该序列长度为 2015bp,开放阅读框为 1452bp,编码 483 个氨基酸。荧光定量 PCR 检测发现 PDI 存在于拟穴青蟹的多个组织中;在拟穴青蟹卵巢发育过程中,PDI 基因的表达量在前 4 个时期逐渐上升,到了第 5 期(成熟期)表达量则下降,表明 PDI 参与了卵巢发育的蛋白合成过程。免疫组化表明,拟穴青蟹卵母细胞存在 PDI 阳性反应,进一步为该分子参与卵巢发育提供了形态学证据。

关键词 蛋白二硫键异构酶;拟穴青蟹;卵巢发育;荧光定量;免疫组化

中图分类号 S917.4

蛋白质合成发生在每一个真核生物中,其中折叠过程也是必需的。至今仅有两个酶被确定为折叠酶:一个是肽基脯氨酸异构酶(peptidyl prolyl isomerase, PPI)(Rahfeld *et al*, 1994),另一个是蛋白二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)(Freedman *et al*, 1994)。PDI 蛋白于 1963 年首次由 Anfinsen 等从人肝组织中分离纯化(熊向华等, 2005);该基因于 1985 年首次由 Edmen 等从大鼠肝中克隆测序(Edmen *et al*, 1985)。目前已知 PDI 广泛存在于不同物种中,包括真菌、植物、动物和人,通过内质网驻留信号驻留在内质网中,是内质网中含量最丰富的蛋白之一,含量达到 mmol 水平(Noiva *et al*, 1992; 熊向华等, 2005)。作为蛋白折叠催化剂, PDI 催化蛋白形成二硫键(氧化活性)和催化错误配对二硫键的重排(异构酶活性)(Gilbert, 1998; Wilkinson *et al*, 2004)。二硫键的形成是许多蛋白折叠途径中的限速步骤, PDI 则是二硫键形成、异构化和重建的关键限速酶(Freedman *et al*, 1994; Darby *et al*, 1995; Gilbert, 1998)。进一步的研究发现, PDI 也具有分子伴侣的功能(Wang *et al*, 1993;

Noiva, 1994; Puig *et al*, 1994),抑制错误折叠蛋白的聚集,如 3-磷酸甘油醛脱氢酶和硫氰酸酶(Cai *et al*, 1994; Song *et al*, 1995)。此外, PDI 还与酵母生孢反应、T 细胞抗原呈递、前胶原成熟加工等多种生物过程有关,甚至构成了另一些酶的亚基,如人脯氨酰-4-羟化酶 亚基(Pihlajaniemi *et al*, 1987)。Liao 等(2008)对长角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*)的研究显示 PDI 可能与卵巢发育有关:对长角血蜱 PDI 的一个亚型 PDI-1 进行 RNA 干扰后,其卵巢发育受到严重影响,大部分卵子无法成熟,而看似成熟的卵子 40d 后仍然无法排卵。

目前,在脊椎动物、大豆、小麦、酵母等物种中已经克隆得到了 PDI 基因(Shimoni *et al*, 1995),但在甲壳动物中对该基因的研究甚少(刘元婧等, 2009),有关 PDI 在卵巢发育过程中的作用尚未见诸报道。拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)隶属节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、梭子蟹科(Portunidae)、青蟹属(*Scylla*),是我国东南沿海重要的海洋经济蟹类之一(林琪等, 2007)。本研究

* 国家自然科学基金项目, 40406030 号, 41076081 号, 31272632 号; 厦门大学基础创新科研基金, 201112G009 号。曾祥兰, 硕士研究生, E-mail: mgfzeng.2006@163.com

通讯作者: 叶海辉, 博士, 教授, E-mail: haihuiye@xmu.edu.cn

收稿日期: 2012-04-26, 收修改稿日期: 2012-06-18

采用 cDNA 末端快速扩增(RACE)方法克隆获得拟穴青蟹的 cDNA 全长, 并运用荧光定量 PCR 方法检测该基因在多个组织中及在卵巢发育过程中的表达情况, 并且应用免疫组化技术检测了 PDI 在卵巢内的定位分布。本研究为进一步了解 PDI 基因的功能及调控机理奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 拟穴青蟹购自厦门市大学路农贸市场, 挑选活性好、附肢健全的雌性个体, 甲壳长度为 6.2—8.8cm, 体重为 150—420g。

1.1.2 主要试剂 TRIzol[®] Reagent Total RNA Isolation Reagent (Invitrogen); RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas); SMART[™] RACE cDNA Application Kit (Clontech); DNase I、RNase、LA Taq[®]、dNTPs、pMD19-T、DNA Marker (TaKaKa); E.Z.N.A 胶回收试剂盒(Omega)。兔抗拟穴青蟹 PDI 抗体由天津赛尔生物技术有限公司惠赠, SABC 免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中已知的拟穴青蟹 PDI 的保守区域的 cDNA 序列设计 5' RACE 特异引物 PDI5R, 用于扩增拟穴青蟹 PDI 基因的 5' 末端(表 1), 以得到该基因全长 cDNA 序列。然后根据得到的全长 cDNA 序列, 设计荧光定量引物 PDIF 和 PDIR(表 1)。

1.2.2 总 RNA 的抽提和 cDNA 第一链的合成 分别取发育期拟穴青蟹各组织(卵巢、眼柄神经节、胸神经团、鳃、心、胃、肝胰腺、性腺、肌肉、表皮); 并取青蟹不同发育周期的卵巢组织, 卵巢发育分期参照上官步敏等(1991)。参照 Invitrogen 公司 Trizol 试剂使用说明提取总 RNA。以紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度及纯度。取各组织 1 μ g 总 RNA, 参照 Fermentas 的 RevertAid[™] First Strand

cDNA Synthesis Kit 使用说明, 反转录成 cDNA 模板, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 PDI 基因全长 cDNA 的克隆 以拟穴青蟹卵巢总 RNA 为模板, 参照 5'-Full RACE Kit(TaKaRa) 使用说明, 合成带 5' 接头的 cDNA 第一条链。以带 5' 接头的 cDNA 第一条链为模板, 用 PDI5R 和试剂盒所带的通用引物 5' RACE Primer 配对, 来扩增 5' 末端。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 热变性 3min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 57 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 32 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物回收纯化后与 pMD19-T(TaKaRa) 载体连接, 转化到 DH5⁺ 感受态细胞, 于含有 AMP 的 LB 平板上培养 14h, 挑取单克隆菌落, 接种于含 AMP 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆并测序。测序结果拼接后得到拟穴青蟹 PDI 基因的全长 cDNA 序列。

1.2.4 PDI 基因 cDNA 全序列分析 应用 ORF Finder 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)确定正确的开放阅读框并推导其编码的氨基酸序列。ProtParam 程序(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)预测氨基酸序列的物理参数; SignalP 3.0 server 程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)预测信号肽; ProtScale 程序(<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>)预测蛋白质的疏水性; 采用 ClustalX 与 MEGA 软件对序列进行同源性的分析, 并采用邻位相接法(neighbor-joining, N-J)构建系统进化树。

1.2.5 PDI 基因的表达量分析 以发育期拟穴青蟹各组织和不同发育周期卵巢为模板, 分别进行 qRT-PCR。反应体系为 20 μ L: 2 \times SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 10 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 荧光定量引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L), 8 μ L 双蒸水。每个样品设置 3 个重复, 用 β -actin 基因作内参, 均一化各样品 cDNA 用量的差异, 引物为 β -actin F 和 β -actin R(表 1)。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 热变性 30s; 94 $^{\circ}$ C 变性 10s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40s, 42 个循环。之后进行融解曲线(Melting curve)分析, 以判定 PCR 扩增反应的特异性。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

引物类别	引物名称	引物序列(5' 3')
5'RACE 特异引物	PDI5R	ATCCAATTCCCAGCCACCATATATGAA
RACE 试剂盒提供的外引物	5'RACEPrimer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
荧光定量引物	PDIF	AACTATTGGCGTAACCGTATCCTC
	PDIR	CACTGGCTGTCTCCTGCGA
β -actin 定量引物	β -actinF	GAGCGAGAAATCGTTCTGTGAC
	β -actinR	GGAAGGAAGGCTGGAAGAGAG

1.2.6 免疫组织化学 将发育期卵巢组织置于 Bouin 氏液中, 4℃ 冰箱过夜, 于梯度酒精中脱水, 石蜡包埋, 切片厚度 6μm。免疫组化程序简述如下: 切片脱蜡至水; 3% H₂O₂-PBS 溶液室温孵育 10min, 以消除内源性过氧化物酶的活性; 滴加 10% 正常山羊血清室温孵育 10min; 滴加兔抗体(稀释度 1:100), 37℃ 孵育 2h; 滴加即用型生物素标记的羊抗兔 IgG, 37℃ 孵育 20min; 滴加即用型链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶, 37℃ 孵育 20min; 0.06% DAB 显色 5—10min; 苏木精复染, 脱水, 透明, 封片。阴性对照实验以正常羊血清代替第一抗体。Olympus BX51 型显微镜下

观察、拍照。

2 结果

2.1 PDI 全长 cDNA 的克隆和序列分析

将测序得到的 5' 末端序列与已知保守区域的序列进行比对拼接, 得到一条完整的 cDNA 序列, GenBank 登录号为 EU679503.1。其全长为 2015bp(包括 polyA), 开放阅读框长度为 1452bp, 编码 483 个氨基酸。此外还有 96bp 的 5'UTR 和 467bp 的 3'UTR, 其中 3'UTR 区域含有典型的加尾信号 AATAAA 和 poly A 尾(图 1)。通过提交拟穴青蟹 PDI 前体肽氨基酸序

```

ACGCGG 6
GGACTCACGGGCTCACCTCTCTTCTCTGCGCGCATTAAACCGTAGACACTTCTCGTGCCGGGTGCAGTCATACACCGGGAC 96
ATGACCATCAAGCTGCTGTTACTTCTGCGGGTGGTGGCGGTGTGCTGGCTGACGATGTGCTGCAGTAAACGATGCGGACTTT 186
1 M T I K L L L L L L L G L V A G C A V A D D V L Q L N D A D F
GACAGTAAACAGGAGTACACGACAGTGTGTTATGTTCTTCGCCCGTGGTGGACATGTAAAGAGACTGAAGCCAGAGTTTAA 276
31 D S K T A S H D T V L V M F F A P W C G H C K R L K P E F E
AAGGTCCTCCACCTGAAAAGCAACGATCCTCTGTATCCTTGCAAAAGTTGACTGCACAGAGGATGAAAAGGACACATGCAGTAGG 366
61 K A A S T L K S N D P P V I L A K V D C T E D G K D T C S R
TCCAGGTGTCAGGCTACCAACCTCAAGATATCAAGGGAGTGAACGTCCACAGACTATAATGGTCCAGAGAAGCAATGGCATT 456
91 F Q V S G Y P T L K I F K G G E L S T D Y N G P R E A N G I
GTCAAATACATGAGATCACAGGTGGGCCGCTCTAAGGAGTTGACTCCATTGAAGTAGCTGAGGCCTTCTTGCAGCACCAGAATC 546
121 V K Y M R S Q V G P A S K E L T S I E V A E A F L A A P E V
AGTGTGTCTACTTTGGAGAGGACTCAAAGCTGAAAGATGCAATCCTGCAGGCAGCTGACAAGCTTCGTGAGACAGTGGTTCGCCAC 636
151 S V V Y F G E D S K L K D A F L Q A A D K L R E T V R F A H
TCTGTCGAGGCTGAGTGGATGAAAAATTTGGACACAAGAATGTGATTGTGCTTTACCGTCCCAAGCATCTTGACAACAAGTTGAGCCA 726
181 S V E A E V D E K F G H K N V I V L Y R P K H L D N K F E P
TCCTCTGGTCTATGATGGATTGGGGATAAGACTGCCATCCAGGCCTCATCAAGAAGAACTACTTTGGTCTGGTGGGGACCCGACC 816
211 S S V V Y D G L G D K T A I Q A F I K K N Y F G L V G H R T
CAAGATGCTGCTGGGGAGTTTGTGCCTCCCGTGGTGGTTATTACAATGTGATTATGTGAAGAATCCCAAGGCACCAACTATTGG 906
241 Q D A A G E F V P P L V V G Y Y N V D Y V K N P K G T N Y W
CGTAACCGTATCCTCAAGTTGCCGAGAAGTTGAGGACTTCAACTTTGGCATCTCCAACAAGATGACTTCCAACAGAGCTCAATGAA 996
271 R N R I L K V A E N F E D F N F G I S N K D D F Q H E L N E
TTTGGTCTGATTTTGTGCGAGGACAAAGCCAGTGTCTGTGCACGGATATTAAAGTCTCAGAAGTTTGTGATGAAGGATGAGTTTACA 1086
301 F G L D F V A G D K P V V C A R D I K S Q K F V M K D E F T
ATGGAGAAGTTGGAGACTTCTCTGACGAGCTTCTGCTGGGGAGCTTGAGCCATACCTCAATCAGAGCCAGTCCCACTCAGGATGGC 1176
331 M E N L E T F L T Q L S A G E L E P Y L K S E P V P T Q D G
CCTGTTACTGTGCTGTGCCAAGAAGTTGAAGAAGTTGTTACAACCTCTGAGAAGATGCTTGTATAGAGTTCTATGCTCCTTGGTGT 1266
361 P V T V A V A K N F E E V V T N S E K D V L I E F Y A P W C
GGCCATTGAAGAAATTTGGCCCAACCTACGATGAGTTGGGGAGGCGATGAAGAATGAGAATGTTGCCATTGTGAAAATGGATGCAACT 1356
391 G H C K K L A P T Y D E L G E A M K N E N V A I V K M D A T
GCCAATGACGTTCCACCATCCTTCAATGTGAGAGGATCCCTACAATTTCTGGAAGCCAGCTGGAGGTTCCCCAGTTTCATATAATGGT 1446
421 A N D V P P S F N V R G F P T I F W K P A G G S P V S Y N G
GGCCGGGAATTGGATGACTTCATCAATATATTGCCAAAGAGGCCACTACGGAGCTCAAGGGATGGGACCGCAAGGGCAAGGCCAGGAAA 1536
451 G R E L D D F I K Y I A K E A T T E L K G W D R K G K A R K
GTGGAGCTGTGAGTGCAGGGCTAGCAGACTGTGTGAGAGTGAGAGAGAAGGAACAATAGCTGGTCCAAAGTTGAAGTCCAATCTTGT 1626
481 V E L *
AAGTAAAGTAGCTGATGAAAAATTAAGTAGTACAGCAATAGGAGAAGCAATAGCCCTGATTTACAACAACCTAAAAACAACCTGAAATC 1716
AGTATTGTAGGAAGGATGACAGGGTGTGGCTGACTTGAGCAGTGGTTGATAAGGTATAGGTGCTGGATGCAAGAGTGAAGTGAAGT 1806
GAGCAAGCAAGCAAGAACTAGTAGATGTAGGGTTATGAATGAATGTTTCAATCAATAAAATGTTTGTGTTAAAGTCTTTGTGAGGAT 1896
GAATTCTGTGATGTTTTTCCCTACAATCACTATACTGAGTGTCTTCTTGGATGAATGCACAAGTTTCTGATACCATCTTTCAGT 1986
TAATAAATTTTGTAAACATAAAAAAAAAA 2015

```

图 1 拟穴青蟹 PDI cDNA 及其推导的氨基酸序列

Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequence of PDI from *S. paramamosain*

注: 信号肽用黑色阴影表示, 下划线所示为 RACE 引物结合位点; *代表终止密码子; 方框所示为 3'UTR 中的加尾信号

列到 BLASTP(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)得到其相应肽段(Specific hits)、普通对应(Non-specific)和对应(hits)的结构域。拟穴青蟹 PDI 由 4 个保守区域组成, 分别为 PDI_a_PDIR(21—124)、PDI_b_ERp57(131—232)、PDI_b'_ERp72_ERp57(236—342)和 PDI_a_PDI_a'_C(361—461), 并在 C 端携带一个特征性的 C-端 KVEL(图 2)。在 PDI_a_PDIR 和 PDI_a_PDI_a'_C 两个保守区域中分别含有一个保守的氧化还原活性位点-CGHC-, 并在其周围显示了较高的保守性。

ProtParam 工具分析结果显示, 拟穴青蟹 PDI 成熟肽含有 464 个氨基酸残基, 分子量为 5188.6Da, 等

电点 pI 为 5.24, 其中疏水性氨基酸 162 个(A、I、L、F、W 和 V), 极性氨基酸 102 个(N、C、Q、S、T 和 Y), 强碱性氨基酸 58 个(K 和 R), 强酸性氨基酸 72 个(D 和 E)。预测其在体外的不稳定指数(Instability index)为 26.17, 低于 40, 为稳定蛋白质, 其在体内的半衰期约为 1h。

SinglaP 3.0 分析拟穴青蟹 PDI, 结果显示有信号肽的可能性(Signal peptide probability)为 100%, 可能性最大的切割位点(Max cleavage site probability)是 A19—D20。因此, 拟穴青蟹 PDI 成熟肽部分的 N-末端第一个氨基酸是天冬氨酸 Asp(D)。

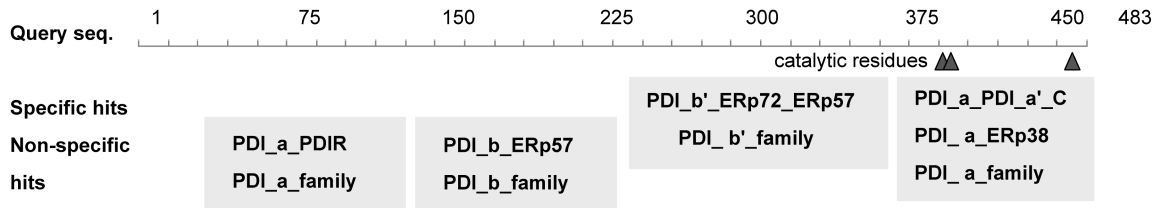


图 2 拟穴青蟹 PDI 基因保守结构域

Fig.2 Conserved domain of PDI in *S. paramamosain*

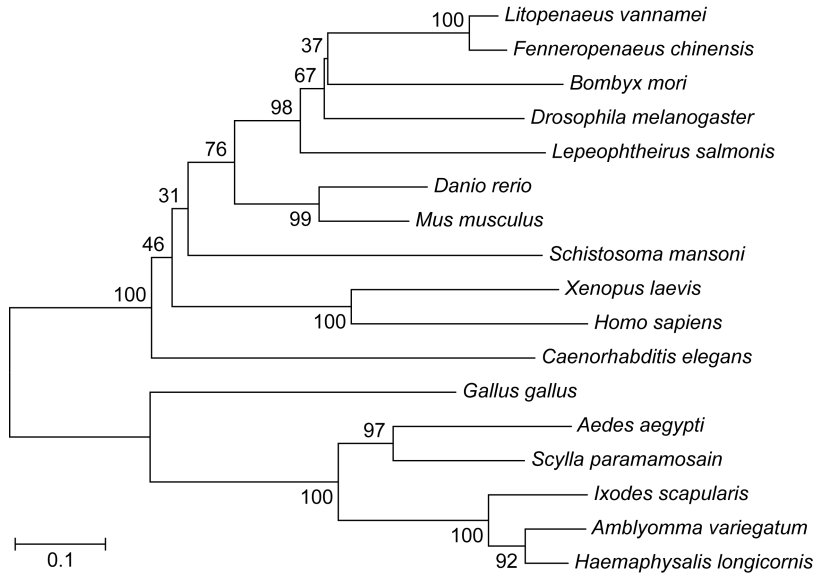


图 3 基于 N-J 法构建的系统发育树

Fig.3 Phylogram based on Neighbor-joining method

Scylla paramamosain: 拟穴青蟹(ACD44938.1); *Schistosoma mansoni*: 曼氏血吸虫(XP_002576968.1); *Caenorhabditis elegans*: 秀丽隐杆线虫(CAA85491.1); *Litopenaeus vannamei*: 凡纳滨对虾(ACN89260.1); *Fenneropenaeus chinensis*: 中国明对虾(AEE36486.1); *Danio rerio*: 斑马鱼(CAQ13615.1); *Xenopus laevis*: 非洲爪蟾(AAR07966.1); *Drosophila melanogaster*: 黑腹果蝇(AAA86480.1); *Mus musculus*: 鼠(AAA39906.1); *Homo sapiens*: 人(AAC50401.1); *Gallus gallus*: 鸡(NP_001006370.1); *Bombyx mori*: 家蚕(NP_001037171.1); *Lepeophtheirus salmonis*: 鲑疮痂鱼虱(ABU41061.1); *Aedes aegypti*: 埃及伊蚊(XP_001659196.1); *Amblyomma variegatum*: 非洲彩饰花蜱(ABD16189.1); *Haemaphysalis longicornis*: 长角硬蜱(ABS50238.1); *Ixodes scapularis*: 肩突硬蜱(AAY66973.1)

Reinhardt 方法分析拟穴青蟹 PDI 在细胞内定位于细胞质内, 可信度为 94.1%。该蛋白 C-羧基端含有内质网滞留信号(ER Membrane Retention Signals) RKVE。

2.2 PDI 序列同源性分析

将拟穴青蟹 PDI cDNA 序列推导的氨基酸与其它物种的同源蛋白在 ClustalX 中进行多序列比对分析, 结果显示拟穴青蟹 PDI 序列与主要模式生物 PDI 相似性分别为果蝇(27.6%)、斑马鱼(31.0%)、非洲爪蟾(28.9%)、家鼠(29.8%)、人(25.8%); 与节肢动物门各物种间 PDI 氨基酸序列的相似性为(22.8%—61.0%), 其中与埃及伊蚊的相似性最高为 61.0%, 其次为非洲彩饰花蜱(57.8%)和长角血蜱(44.2%), 其它物种相似性从高到低排列分别为黑脚硬蜱(28.8%)、致倦库蚊(28.5%)、家蚕(27.9%)、果蝇(27.6%)、鲑疮痂鱼虱(22.8%)。图 3 是用 ClustalX 对实验所得拟穴青蟹的氨基酸序列与已有的其它一些物种进行对比后, 以 Mega 软件的邻位相接法绘制的系统进化树。

2.3 PDI 基因的表达分析

2.3.1 PDI 基因在各组织中的表达 依据实验所得拟穴青蟹 PDI cDNA 序列设计特异引物 PDIF、PDIR, 利用 qRT-PCR 技术检测 PDI 基因在拟穴青蟹不同组织中的表达情况。结果显示, PDI 在所检测的 11 个组织(肌肉、胸神经团、卵巢、血淋巴、脑、眼柄神经节、心脏、肝胰腺、鳃、胃、表皮)中均有表达, 在卵巢中表达量最高而眼柄神经节中表达量最低(图 4)。

2.3.2 PDI 基因在卵巢发育过程中的表达 为了检测不同卵巢发育时期 PDI 基因的表达量, 提取了拟穴青蟹未发育期、发育早期、发育期、将成熟期和成熟期的卵巢总 RNA。qRT-PCR 结果显示, PDI 基因从未发育期(期)到将成熟期(期)表达量逐渐上升, 在将成熟期达到峰值, 之后在卵巢成熟期(期)表达量下降(图 5)。

2.3.3 PDI 蛋白在卵巢中的定位 免疫组化显示, PDI 在卵母细胞中具有阳性反应, 免疫阳性物质为棕褐色, 在细胞质中呈现点状和斑块分布(图 6)。

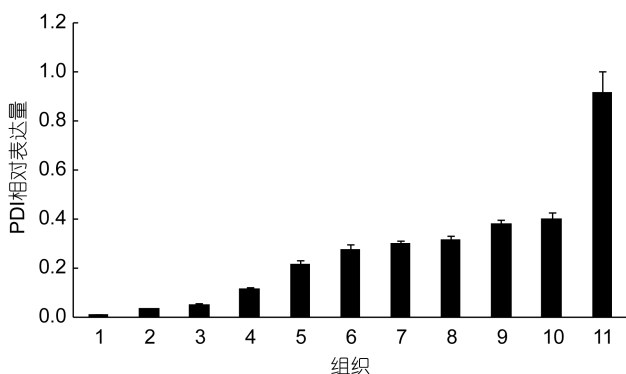


图 4 拟穴青蟹 PDI 基因在成体组织中的表达

Fig.4 Expression of PDI mRNA in adult tissues of *S. paramamosain*

1. 眼柄神经节; 2. 胃; 3. 鳃; 4. 表皮; 5. 胸神经团; 6. 脑神经节; 7. 肝胰腺; 8. 心脏; 9. 肌肉; 10. 血淋巴; 11. 卵巢

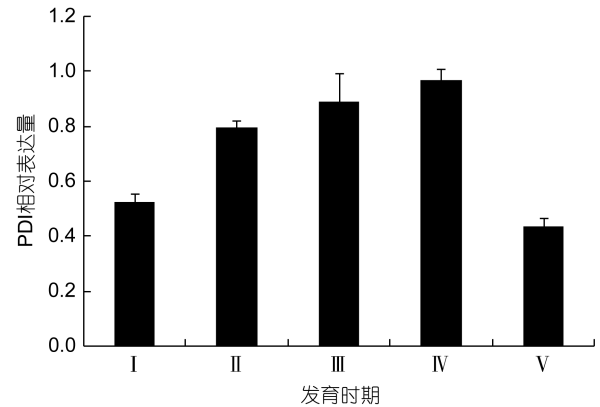


图 5 拟穴青蟹 PDI 基因在各卵巢发育期的表达

Fig.5 Expression of PDI mRNA at different ovarian development stages of *S. paramamosain*

- 未发育期; · 发育早期; · 发育期; · 将成熟期; · 成熟期

3 讨论

迄今甲壳动物 PDI 基因及其功能鲜有报道。本研究通过 RACE 技术获得了拟穴青蟹 PDI cDNA 序列, 全长为 2015bp (GenBank 登录号: EU679503.1), 包括 1452bp 的 ORF, 编码 483 个氨基酸。序列分析发现, 拟穴青蟹 PDI 与其它物种中的同源蛋白的相似性不高, 与果蝇、斑马鱼、非洲爪蟾、家鼠和人的相似率为 27.6%、31.0%、28.9%、29.8%和 25.8%。与节肢动物门中所报道的其它物种的 PDI 氨基酸序列相比较, 相似性也只有 22.8%—62.0%, 与其最相似的是埃及伊蚊(62%)。与甲壳纲(凡纳滨对虾、中国明对虾、鲑疮痂鱼虱)已知的 PDI 相似率反而较低, 分别为 40%、39%、22.8%。虽然 PDI 的总体相似性不高, 但拟穴青蟹 PDI 在其保守区域显示了比较高的相似性。

本研究利用 qRT-PCR 技术首次对甲壳动物 PDI 基因的组织表达进行了分析, 发现拟穴青蟹 PDI 基因在所检测的 11 个组织(肌肉、胸神经团、卵巢、血淋

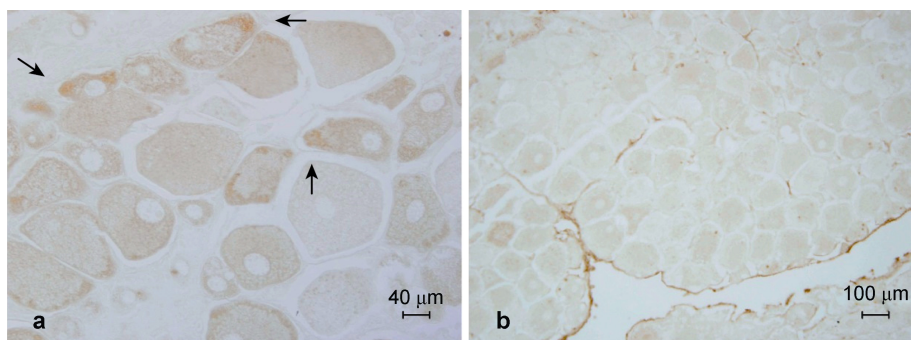


图 6 拟穴青蟹卵母细胞 PDI 免疫组化反应

Fig.6 PDI immunoreactivity in the oocytes of *S. paramamosain*

- a. 箭头所示为免疫阳性细胞; b. 阴性对照结果

巴、脑、心脏、肝胰腺、鳃、胃、表皮、眼柄神经节)中均有表达,且在卵巢中表达量最高,血淋巴和肌肉次之,其它组织的表达量较低。拟穴青蟹 PDI 基因在卵巢中的高表达,提示其可能在卵巢发育中具有重要作用。

组织学研究表明,拟穴青蟹 期卵巢的卵子发生处于相对静止状态; 期卵巢主要为卵原细胞的增殖、卵母细胞的形成和卵黄发生前期的准备阶段;

和 期卵巢为卵母细胞的初级和次级卵黄发生阶段,是卵黄蛋白旺盛发生期; 期卵巢的卵母细胞已经完成了卵黄发生,为生理成熟期,等待受精(上官步敏等,1991)。迄今,甲壳动物卵巢发育的分子机制了解尚少(解银洁等,2012)。本研究发现拟穴青蟹从 期至 期的卵巢发育中 PDI 基因表达量逐渐上调,推测该过程需要 PDI 参与卵黄蛋白的积累,这与 PDI 作为折叠酶和分子伴侣的作用一致(Wang *et al*, 1993; Novia, 1994; Puig *et al*, 1994; Luz *et al*, 1996; Gilbert, 1998)。 期卵巢已经发育成熟, PDI 基因表达量下调,与该期已经成熟不再进行卵黄发生有关。免疫组化检测到 PDI 定位于拟穴青蟹卵母细胞的细胞质,这与生物信息学方法预测的结果一致。该结果为 PDI 在细胞质中参与卵黄发生的作用提供了形态学证据。

本研究首次克隆得到拟穴青蟹 PDI 基因 cDNA 全长序列,并对其结构及表达规律进行了分析,为进一步揭示 PDI 基因的生理功能奠定基础,同时也为阐明拟穴青蟹卵巢发育的分子机制提供科学依据。

参 考 文 献

- 上官步敏,刘正琮,李少菁,1991. 锯缘青蟹卵巢发育的组织学观察. 水产学报, 15(2): 96—103
- 刘元婧,杨玉荣,叶海辉等,2009. 拟穴青蟹 PDI 保守区域的克隆与序列分析. 厦门大学学报(自然科学版), 48(6): 894—899
- 林 琪,李少菁,黎中宝等,2007. 中国东南沿海青蟹属(*Scylla*)的种类组成. 水产学报, 31(2): 211—219
- 解银洁,黄辉洋,叶海辉等,2012. 拟穴青蟹卵泡抑素相关蛋白基因的克隆和表达分析. 水产学报, 36(8): 1201—1208
- 熊向华,刘志敏,2005. 二硫键异构酶. 中国生物工程杂志, S1: 176—179
- Cai H, Wang C C, Tsou C L, 1994. Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. The Journal of Biological Chemistry, 269(40): 24550—24552
- Darby N J, Morin P E, Talbo G *et al*, 1995. Refolding of bovine pancreatic trypsin inhibitor via non-native disulfide intermediates. The Journal of Molecular Biology, 249(2): 463—477
- Edmen J C, Ellis L, Blacher R W *et al*, 1985. Sequence of protein disulfide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. Nature, 317: 267—272
- Freedman R B, Hirst T R, Tuite M F, 1994. Protein disulphide-isomerase: Building bridges in protein folding. Trends in Biochemical Sciences, 19(8): 331—336
- Gilbert H F, 1998. Protein disulfide isomerase. Methods Enzymes, 290: 26—50
- Liao M, Boldbaatar D, Gong H *et al*, 2008. Functional analysis of protein disulfide isomerase in blood feeding, viability and oocyte development in haemaphysalis longicornis ticks. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 38(3): 285—295
- Noiva R, 1994. Enzymatic catalysis of disulfide formation. Protein Expression and Purification, 5(1): 1—13
- Noiva R, Lennarz W J, 1992. Protein disulfide isomerase: A multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. The Journal of Biological Chemistry, 267(6): 3553—3556
- Pihlajaniemi T, Helaakoski T, Tasanen K *et al*, 1987. Molecular cloning of the β -subunit of human poly(14-hydroxylase): this subunit and protein disulphide isomerase are products of the same gene. The Journal of Europe Molecular Biology Organization, 6(3): 643—649
- Puig A, Gilbert H F, 1994. Protein disulfide isomerase exhibits chaperone and anti-chaperone activity in the oxidative refolding of lysozyme. The Journal of Biological Chemistry, 269: 7764—7771
- Rahfeld J U, Rucknagel K P, Schelbert B *et al*, 1994. Conformation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. The Journal of the Federation of European Biochemical Societies, 352(2): 180—184
- Shimoni Y, Zhu X Z, Levanony H *et al*, 1995. Purification, characterization, and intracellular localization of glycosylated protein disulfide isomerase from Wheat grains. Plant Physiology, 108(1): 327—335
- Song J L, Wang C C, 1995. Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of rhodanese. European Journal of Biochemistry, 231(2): 312—316
- Wang C C, Tsou C L, 1993. Protein disulfide isomerase is both an enzyme and a chaperone. The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 7(15): 1515—1517
- Wilkinson B, Gilbert H F, 2004. Protein disulfide isomerase. Biochimica et Biophysica Acta, 1699(1): 35—44

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE GENE IN THE MUD CRAB (*SCYLLA PARAMAMOSAIN*)

ZENG Xiang-Lan, LIU Yuan-Jing, ZENG Hui, HUANG Hui-Yang,
YE Hai-Hui, WANG Gui-Zhong

(College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract Protein disulfide isomerase (PDI) is a multifunctional protein in all eukaryotic cells for assisting many protein maturation processes within the endoplasmic reticulum (ER). We cloned and characterized PDI gene from mud crab *Scylla paramamosain*, and studied its localization and developmental expression. The full length of cDNA was 2016bp long with an ORF of 1452bp encoding a putative peptide of 483 amino acids (aa). The deduced aa sequence of Sp-PDI showed high similarity to related sequences of other species. Molecular analysis was carried out by examining gene expression via real-time quantitative RT-PCR. In the crabs of same developmental stage and size, Sp-PDI transcripts occurred in all the various tissues, including ovary, hepatopancreas, hemocyte, muscle, heart, thoracic ganglia, cerebral ganglia, stomach, gill, eyestalk, and epidermis. In the ovaries of different stages, Sp-PDI expression increased gradually until it become matured and then decreased at last. By means of immunochemistry, PDI reactivity was found in the oocyte of *S. paramamosain*. These results suggest that Sp-PDI is implicated during the growth and ovarian development.

Key words protein disulfide isomerase; *Scylla paramamosain*; ovarian development; real-time quantitative RT-PCR; immunochemistry