

福建牡蛎新基因SMRP1的功能分析

杨丙晔^{1,2} 李莹¹ 陈仲巍^{1*}

(1. 厦门医学院 厦门市医用海洋天然产物与细胞工程重点实验室 福建 厦门 361023 ;

2. 厦门大学 海洋与地球学院 福建 厦门 361005)

摘要 :通过对福建牡蛎幼体不同发育时期的转录组文库比对分析,结果显示牡蛎附着变态相关蛋白1(settlement and metamorphosis related protein1, SMRP1)基因在幼体附着变态时期高表达,利用定量即时聚合酶链锁反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)技术确认了SMRP1基因在幼体附着变态时期高表达,且进一步发现SMRP1集中表达在牡蛎鳃和外套膜组织中,具有明显的组织特异性。利用组织和整体原位杂交技术检测SMRP1基因在不同时期幼体以及成体的外套膜和鳃组织中的表达定位情况,发现SMRP1基因集中表达在幼体壳顶时期到眼点幼虫的时期,在成体鳃和外套膜组织集中表达在组织的外层上皮细胞中。结合牡蛎幼体在附着变态时期鳃丝的快速生长发育及其在成体外套膜中的功能作用分析表明SMRP1基因对牡蛎幼体鳃和外套膜的形成和生长发育具有重要的作用。该研究为解析胰岛素相关多肽受体信号通路的功能提供数据支持。

关键词 福建牡蛎;幼体;附着变态;鳃;外套膜;附着变态相关蛋白1

Functional Analysis on A Novel Gene SMRP1 from Fujian *Crassostrea angulata*

YANG Bing-ye^{1,2}, LI Ying¹, CHEN Zhong-wei^{1*}

(1. Xiamen Key Laboratory of Marine Medicinal Natural Products and Cell Engineering, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, Fujian, China; 2. College of Ocean and Earth Science, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract : Based on the larval transcriptome libraries of Fujian *Crassostrea angulata*, a new gene sequence named settlement and metamorphosis related protein (SMRP1) was obtained, which expressed highly in the larvae on the settlement and metamorphosis stage. By quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR), SMRP1 was found which was expressed ubiquitously in many oyster tissues, but significantly expressed in the gill and mantle tissues. The SMRP1 spatial expression profile of mRNA was detected from different developmental larva, mantle and gill by the whole mount and tissue slicing in situ hybridization. SMRP1 concentrated expressed in umbo-veliger larvae and the eyespot larvae and located remarkably in the peripheral epithelial cells from the gill and mantle tissues. The results suggest that SMRP1 gene play considerable role in the growth of gill and mantle tissues and conclude that SMRP1 maybe is a unique growth factor of the oyster.

Key words : Fujian *Crassostrea angulata*; larvae; settlement and metamorphosis; gills; mantle; settlement and metamorphosis related protein1

引文格式:

杨丙晔,李莹,陈仲巍.福建牡蛎新基因SMRP1的功能分析[J].食品研究与开发,2019,40(10):177-181

YANG Bingye, LI Ying, CHEN Zhongwei. Functional Analysis on A Novel Gene SMRP1 from Fujian *Crassostrea angulata*[J]. Food Research and Development, 2019, 40(10):177-181

基金项目 福建省科技厅青年基金(2016D024),厦门市科技局科技计划项目(3502Z20154078),厦门医学院自然科学类科研计划项目(K2016-18)
作者简介 杨丙晔(1982—)男(汉),讲师,博士,主要从事海洋药物、蛋白质工程、分子生物学等研究。

*通信作者 陈仲巍(1982—)男,实验师,本科,学士,主要从事生物制药、海洋药物等研究。

基因注释的方法首先是利用已有数据库对基因的核酸或蛋白序列进行比对分析,通过对基因序列资料中各类信息进行识别和比较,可以寻找序列之间的同源性和进化关系,建立基因序列结构和功能的关系。利用实验室建立的福建牡蛎幼体不同发育时期的转录组文库发现在幼体附着变态时期高表达基因 SMRP1 (settlement and metamorphose related protein1),利用美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 搜索比对发现 SMRP1 只有在太平洋牡蛎里有同源序列,说明 SMRP1 可能是牡蛎特有的一个未知基因,而且在现有已经发现的结构域中没有发现与之相匹配的。

基因的表达在个体发育的不同阶段以及不同的组织甚至细胞类型中是不同的,也叫基因表达的时空差异^[1]。对一个基因的时空表达谱进行研究分析,是研究一个未知基因功能的基础,原位杂交技术从 1969 年创立以来已经分化成两个大的方面的应用,整体原位杂交和组织切片原位杂交。整体原位杂交主要用于检测特定基因在生物体的不同发育时期表达位置的分析,组织切片原位杂交主要用于检测基因在生物体的组织或细胞中的特定位置的表达分析,两者可以相辅相成地对基因表达特异器官或组织定位进行分析,进而将基因的功能与生物体的发育过程相联系^[2]。定量即时聚合酶链锁反应 (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 主要有半定量 RT-PCR, 实时定量 RT-PCR 和竞争性定量 RT-PCR 3 种, 其中实时定量 RT-PCR 以其特异性强和自动化高的特点得到广泛的应用^[3]。本研究利用实时定量 RT-PCR 对 SMRP1 在福建牡蛎不同发育阶段幼体和不同组织器官的特异性表达进行研究,继而用原位杂交技术对福建牡蛎不同发育阶段幼体和高表达组织中进行定位研究。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

荧光定量 Mix 美国 Thermo 公司;反转录试剂盒:日本 TaKaRa 公司;TRIzol 试剂、抗地高辛抗体:美国 Roche 公司;NBT/BCIP 显色试剂盒:中国索莱宝生物公司。

Gemini AS 自动组织脱水机、ASP300S 自动染色机: Thermo Fisher;EG1140 石蜡包埋机、RM2235 轮转式切片机 Leica;YKN-ECA-FZ01 杂交炉:Midwest;BX53 多功能显微镜:Olympus。

1.2 SMRP1 基因在牡蛎幼体不同发育时期转录组文库表达分析

通过对福建牡蛎幼体 5 个不同时期的转录组文库比对分析获得 SMRP1 基因序列。使用 Bioedit 软件,从实验室构建获得的福建牡蛎幼体 5 个不同时期的转录组文库数据中搜索 SMRP1 基因的有效序列,依据 SMRP1 基因在转录组文库中的有效序列制作 SMRP1 基因在福建牡蛎幼体 6 个不同发育时期的表达图。

1.3 SMRP1 基因在牡蛎幼体不同发育时期和不同组织的 qRT-PCR 表达分析

从育苗场分别获得 6 个不同时期的福建牡蛎幼体:担轮幼体、D 形幼体、壳顶幼体、眼点幼体、附着变态幼体和稚贝,将幼体集中收集到培养皿中,在培养皿中逐滴加入 1 mol/L 的 MgCl₂ 溶液,并且不时的在显微镜下观察,发现幼体从浮游状态到沉到底部且组织器官没有活动迹象时,将幼体收集到 1.5 mL 的离心管中,将含有 MgCl₂ 的海水尽量吸取干净,加入 4% 的多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA)。每个时期幼体取 3 组平行样品。从厦门市第八市场获取新鲜捕捞的福建牡蛎成体,解剖后获得牡蛎 7 种不同组织样品,每个组织样品获取 3 个平行样品。样品加入 TRIzol 试剂,依据 TRIzol 试剂提取的方法提取不同样品的总核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA),ND-1000 测定 RNA 的浓度。使用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒,以 1.5 μg 总 RNA 作为反转录模板,制备不同发育时期和不同组织的互补脱氧核糖核酸 (complementary deoxyribonucleic acid, cDNA) 文库,设计 SMRP1 基因特异性引物(表 1),以反转录产物稀释 10 倍为模板,18S 核糖体 RNA 为内参基因,用 ABI7500 热循环仪检测 SMRP1 基因在福建牡蛎幼体不同发育时期的表达变化^[4]。荧光定量的数据处理采用公式: $N=2^{-\Delta Ct(A-18)}$ (Ct 代表荧光定量热循环仪所采集到循环数)。

不同发育阶段的表达数据比较采用 SPSS 软件分析差异。

表 1 引物序列

Table 1 List of primers sequences

名称	试验	序列(5'-3')
SMRP1-F1	qRT-PCR	TACAAGCCGCTGGGTTGGA
SMRP1-R1	qRT-PCR	TTTTGCCGCCATGGAAT
SMRP1-F2	WISH	GGACGATGGATATGCTGGTGGT
SMRP1-R2	WISH	ATGGCTGGACTTACTGGGACGA
18S-F	qRT-PCR	CGGGG AGGTA GTGACGAA
18S-R	qRT-PCR	ACCAG ACTTG CCCTC CAA

1.4 SMRP1 基因在福建牡蛎鳃和外套膜中的表达定位分析

利用设计的 SMRP1 基因特异性引物(表 1),PCR 扩增获得 429 bp SMRP1 基因片段,将 429 bp 的片段克隆到 PGEM-T EASY 载体中,测序确定 PGEM-T EASY 载体中 SMRP1 基因拍片段的正确性 利用克隆好的 PGEM-T EASY 载体为模板,扩增获得带有 T7 和 SP6 启动子序列的 DNA 片段.使用 DIG-RNA labeling Kit 试剂盒获得 SMRP1 基因的特异原位杂交探针。

切片原位杂交:解剖新鲜采购的福建牡蛎成体,获得鳃和外套膜组织,将组织样品固定于 4%的多聚甲醛溶液中,4℃固定过夜。磷酸缓冲液洗 3 次,每次 10 min,然后依次浸泡于 25%、50%和 75%乙醇溶液中各 10 min。然后进行样品的透明和包埋。将包埋好的样品用组织切片器切片,切片的厚度为 5 μL,切片展片于多聚赖氨酸包埋好的载玻片上,42℃烘烤 3 h。然后参考牡蛎性腺切片原位杂交的方法^[5],对牡蛎鳃和外套膜进行表达定位试验。

1.5 SMRP1 基因在牡蛎幼体发育过程中的组织定位分析

从育苗场分别获得 3 个不同发育时期的牡蛎幼

体: D 形幼体、壳顶幼体、和眼点幼体,取样方法参照文章 1.3 部分,幼体 4%的多聚甲醛固定之后,分别用 25%、50%、75%和 100%甲醇脱水,每次 5 min。最终在 100%的甲醇中-20℃保存待用。整体原位杂交参照在海鞘生物中的试验方法^[6]。

2 结果与分析

2.1 SMRP1 基因在牡蛎幼体不同发育时期和不同组织的表达分析

通过比对分析福建牡蛎幼体 5 个不同时期的转录组文库获得 SMRP1 基因序列。对获得的 SMRP1 的核酸和蛋白序列的分析如图 1 所示,全长 1 468 bp 编码 396 氨基酸。核酸序列含有一个起始密码子和终止密码子,且在序列后部含有一个加尾信号。

利用不同发育时期的转录组文库分析 SMRP1 在幼体不同发育阶段的表达情况,结果如图 2 所示,SMRP1 基因在牡蛎幼体的 6 个发育时期中眼点幼体、变态过程中和稚贝时期表达相对较高,尤其是在变态过程中表达最高。通过 qRT-PCR 检测验证发现,SMRP1 基因除了在变态前后时期和变态过程中表达很高之外,在壳顶的初期表达量也相对会高些。

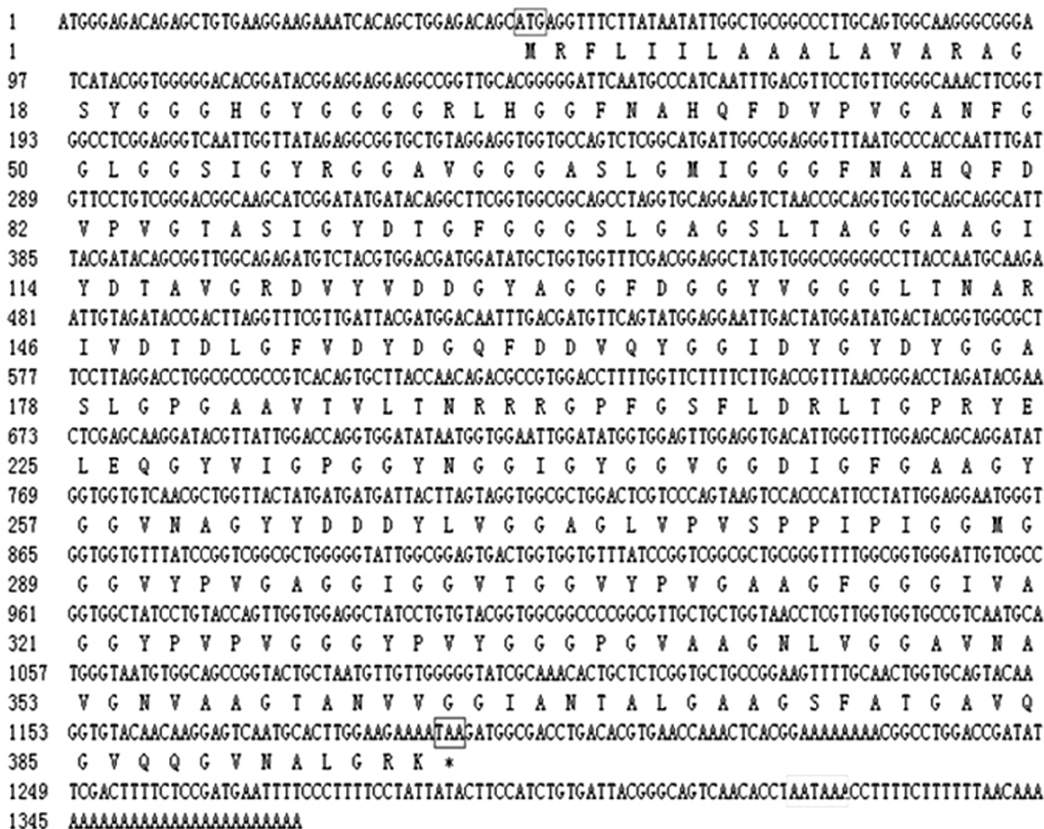


图 1 SMRP1 基因的核酸和蛋白序列分析 Fig.1 SMRP1 cDNA sequence and protein sequence analysis

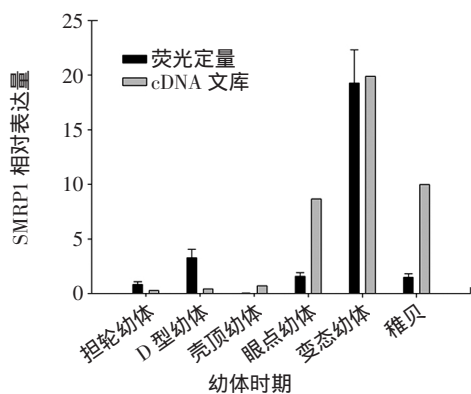


图2 SMRP1 基因组在不同发育时期幼体表达

Fig.2 SMRP1 gene expression pattern during different development stages

2.2 SMRP1 基因组织特异性表达分析

qRT-PCR 检测结果如图3所示。

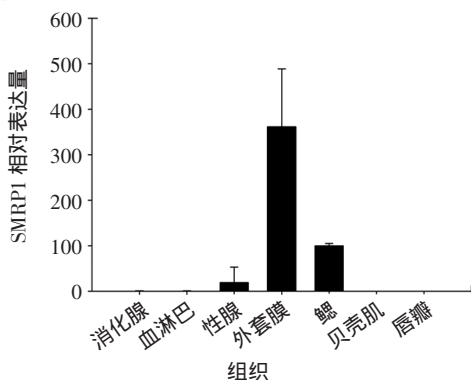


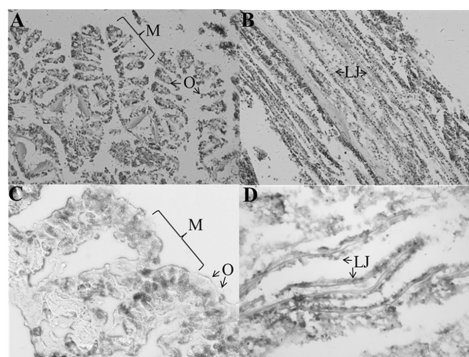
图3 SMRP1 基因在不同组织器官的表达结果

Fig.3 SMRP1 gene expression pattern from different tissues

由图3可知 SMRP1 基因在牡蛎中具有明显的组织特异性。SMRP1 基因在外套膜和鳃组织中表达量明显高于其它组织 特别是在外套膜中的表达量尤其高。

2.3 SMRP1 基因在鳃组织中的表达定位分析

利用组织原位杂交技术 获得 SMRP1 基因在福建牡蛎鳃组织中的表达定位结果如图4所示。



A和B为HE染色结果 C和D为组织原位结果。

M为主鳃丝 D为普通鳃丝 LJ为鳃瓣。

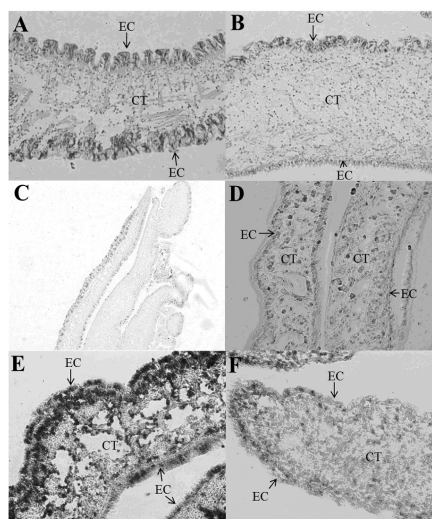
图4 SMRP1 mRNA在鳃组织中的空间表达分析

Fig.4 SMRP1 mRNA spatial expression analysis in gill tissue

SMRP1 基因主要在福建牡蛎鳃主鳃丝和普通鳃丝外表皮细胞中 还有表达在瓣间连接的一些外表皮细胞上。

2.4 SMRP1 基因在外套膜组织中的表达定位分析

利用组织原位杂交技术 获得 SMRP1 基因在福建牡蛎外套膜组织中的表达定位结果如图5所示 SMRP1 基因主要表达在牡蛎外套膜组织边缘的外表皮细胞中。



A、B和C为HE染色结果 D、E和F为组织原位结果。

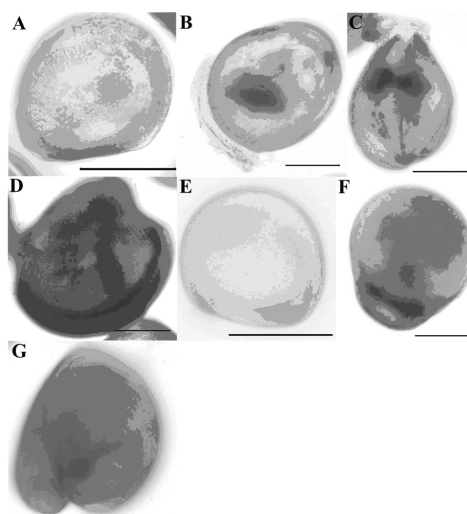
EC为上皮细胞 CT为结缔组织。

图5 SMRP1 mRNA 在外套膜组织中的空间表达分析

Fig.5 SMRP1 mRNA spatial expression analysis in mantle tissue

2.5 SMRP1 基因在幼体不同发育时期的组织定位分析

利用整体原位杂交技术 获得 SMRP1 基因在牡蛎不同发育时期幼体中的表达分析结果如图6所示。



A、B、C和D为整体原位结果 E、F和G为阴性对照。

图6 SMRP1 mRNA 在不同发育时期幼体空间表达分析

Fig.6 SMRP1 mRNA spatial expression analysis in different development stages

SMRP1 基因从牡蛎壳顶幼体初期开始大量表达,且可以观察到 SMRP1 基因在壳顶时期集中表达在身体中部偏壳开口的位置。幼体发育到眼点时期可以明显的观察到 SMRP1 基因大量集中表达在外套膜的边缘位置。

3 讨论与结论

福建牡蛎是我国重要的海水经济养殖贝类,特别是在福建沿海地带,是牡蛎的主要养殖贝类,福建牡蛎是典型的滤食性动物,滤食性贝类鳃的作用非常重要,具有呼吸和摄食的双重作用^[7],海水被牡蛎吸入体内后,流经鳃组织,鳃丝上的纤毛一方面有过滤食物的作用,通过纤毛的运动将食物运到口处,另一方面的功能可以进行气体交换。所以鳃的生长与发育直接影响到牡蛎的生长发育。

通过对福建牡蛎幼体不同发育转录组库分析发现幼体附着变态时期高表达基因 SMRP1, SMRP1 主要分布在牡蛎鳃的主鳃丝和普通鳃丝的上皮细胞里,这些柱状的上皮细胞具有非常重要的作用,他们通过控制自身上的纤毛来控制对食物的运送。SMRP1 基因还有一个主要分布区就是在瓣间连接上的扁平细胞里,瓣间连接是由 2 排单层扁平细胞及其腔隙构成,腔隙内为含血腔的结缔组织。瓣间连接的扁平细胞区是牡蛎的呼吸上皮区^[8-9],是鳃丝与外界进行气体交换的部位。由此可见 SMRP1 基因的主要表达在鳃组织的 2 大功能区域。SMRP1 基因的功能是与生长发育密切相关的,可见 SMRP1 基因对福建牡蛎鳃组织的生长和发育起着重要的作用,进而直接影响牡蛎进食和呼吸。

贝类外套膜组织形态学和组织化学方面的研究已经很多^[10-11],牡蛎的外套膜有左右 2 片,每片由外侧上皮细胞、内侧上皮细胞和中央的结缔组织组成,外套膜的边缘分成 3 部分,外层、中层和内层,外层称为生壳突起,主要功能是分泌贝壳,中层称为感觉突起对外界刺激反应灵敏,专司感觉作用;内层称为缘膜突起可以伸展和收缩,控制进水孔的通道,具调节水流的作用。外层壳侧的表皮细胞中含有大量的嗜碱性粒,推测是碱性磷酸酶的酶原粒,该酶是碳酸钙结晶的关键酶^[12-13],所以外套膜壳侧的表皮细胞对贝壳的生长具有重要的作用。而中层的感觉作用主要也是通

过其突起的表皮细胞来完成的。跟生长密切相关的 SMRP1 基因集中分布在外套膜的表皮细胞中,对外套膜表皮细胞生长的调节具有非常重要的作用。

综上所述,SMRP1 基因主要表达在外套膜和鳃的关键功能区域的表皮细胞中,对外套膜和鳃的生长发育具有重要的调控作用,从而直接影响了其组织功能的发挥。

参考文献:

- [1] 张景舒,田保明,杨妍,等.棉花纤维发育相关基因时空表达特性的差异比较[J].分子植物育种,2015,13(10):2215-2223
- [2] 王燕,陈清,陈涛,等.基因组原位杂交技术及其在园艺植物基因组研究中的应用[J].西北植物学报,2017,37(10):2087-2096
- [3] 马鹏,李林杰,常秋燕,等. BVDV SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法与 RT-PCR 方法的建立与应用[J].华北农学报,2017,32(5):49-53
- [4] Livak K J, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [5] Yang B Y, Li J B, Zeng Z, et al. Cloning and Characterization of the Dopamine Like Receptor in the Oyster *Crassostrea angulata* and Its Expression During the Ovarian Cycle[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2013, Part B 164(3): 168-175
- [6] Hinman V F, Degnan B M. Retinoic acid perturbs Otx gene expression in the ascidian pharynx. Development Genes and Evolution, 2000, 210(3): 129-139
- [7] 王芳,董双林,范瑞青,等.四种滤食性贝类滤食器官鳃的扫描电镜观察[J].青岛海洋大学学报自然科学版,1998,28(2):240-244
- [8] 崔龙波,陆瑶华,刘传琳,等.栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)鳃的形态学研究[J].烟台大学学报:自然科学与工程版,1998,11(4):279-284
- [9] 崔龙波,周雪莹,陆瑶华.皱纹盘鲍鳃的光镜和电镜研究[J].海洋学报,2004,26(1):82-87
- [10] Beedham GE. Observation on the mantle of the lamellibranchia[J]. Proc Zool Soc Lond, 1965, 145: 181-197
- [11] Dix TG. Histology of the mantle and pearl sac of the pearl oyster - *Pinctada maxima* (Lamellibranchia)[J]. J Malac Soc, 1972, 2: 365-374
- [12] 杜晓东,何海平,吴熙载.褶文冠蚌珍珠囊发育的研究[J].水生生物学报,1991,15(3):227-233
- [13] Dix TG. Histochemistry of the mantle and pearl sac secretory cells in *Pinctada maxima* (Lamellibranchia)[J]. J Zool, 1972, 20: 359-368

收稿日期 2018-09-28