

校编码: 10384  
学号: 21620071151985

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_  
UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

锯缘青蟹几丁质酶系的克隆表达  
与组织分布

Molecular Cloning, Expression and Tissue Distribution of  
the Chitinase Family of Mud Crab (*Scylla serrata*)

王 焯

指导教师姓名: 陈清西 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2010 年 04 月 日

论文答辩时间: 2010 年 05 月 日

学位授予日期: 2010 年 月 日

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2010 年 05 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 目 录

中文摘要 .....	1
Abstract .....	2
缩略词表 .....	4
1.引言 .....	5
1.1 锯缘青蟹的概况 .....	5
1.1.1 形态特征 .....	5
1.1.2 繁殖 .....	5
1.1.3 蜕壳与生长 .....	6
1.1.4 锯缘青蟹养殖存在的问题与研究概况 .....	7
1.2 几丁质和几丁质酶系 .....	8
1.2.1 几丁质酶的分类 .....	9
1.2.2 几丁质酶的超二级结构 .....	10
1.2.2.1 几丁质酶催化区 .....	10
1.2.2.2 几丁质结合区 .....	10
1.2.2.3 Fn III 结构域 .....	11
1.2.2.4 Cadherin-like 结构域 .....	12
1.2.3 几丁质酶的三维结构 .....	12
1.2.4 几丁质酶的功能与应用 .....	12
1.2.5 甲壳动物几丁质酶的研究情况 .....	14
1.3 本课题的研究内容与研究意义 .....	15
2.实验材料、仪器与方法 .....	17
2.1 材料与试剂 .....	17
2.1.1 实验动物 .....	17
2.1.2 菌种与质粒 .....	17
2.1.3 常用培养基 .....	17
2.1.4 常用溶液的配制 .....	17
2.2 仪器 .....	20

2.3 实验方法.....	21
2.3.1 锯缘青蟹基因组 DNA 的提取.....	21
2.3.2 锯缘青蟹几丁质酶的分子克隆.....	21
2.3.2.1 总 RNA 的提取.....	21
2.3.2.2 EST 的搜索.....	22
2.3.2.3 引物设计.....	22
2.3.2.4 青蟹几丁质酶的中间片段扩增.....	22
2.3.2.5 3' RACE.....	23
2.3.2.6 反向 PCR 扩增 5 端.....	24
2.3.2.7 PCR 扩增产物的电泳检测及目的片段的回收.....	26
2.3.2.8 目的片段与 pMD-18T 连接.....	26
2.3.2.9 转化.....	26
2.3.2.10 重组子鉴定.....	26
2.3.2.11 核苷酸序列的测定与分析.....	26
2.3.2.12 几丁质酶推导蛋白质序列分析及结构预测.....	26
2.3.2.13 系统发生树的构建.....	26
2.3.3 实时荧光定量 PCR 法检测组织表达特异.....	27
2.3.3.1 锯缘青蟹的选择与组织分离.....	27
2.3.3.2 荧光 PCR.....	27
2.3.4 Schi3 基因在大肠杆菌中的表达研究.....	28
2.3.4.1 Schi3 基因 cDNA 序列 ORF 的扩增.....	29
2.3.4.2 PCR 产物和表达载体的酶切.....	29
2.3.4.3 大肠杆菌表达载体的构建.....	29
2.3.4.4 Schi3 基因在大肠杆菌中的诱导表达.....	31
2.3.4.5 SDS-PAGE 电泳分析.....	31
2.3.4.6 包涵体溶解后的透析复性.....	31
2.3.4.7 用 Ni-NTA His.Bind Resin 纯化融合蛋白.....	32
2.3.4.8 以胶体几丁质酶为底物的酶活性测定.....	32
3.实验结果与分析.....	33

3.1 锯缘青蟹基因组 DNA 的提取 .....	33
3.2 锯缘青蟹几丁质酶 18 家族的基因克隆 .....	33
3.2.1 甲壳纲几丁质酶已知信息 .....	33
3.2.2 锯缘青蟹总 RNA 的提取 .....	34
3.2.3 Schi1 基因的克隆 .....	34
3.2.4 Schi2 基因的克隆 .....	37
3.2.5 Schi3 基因的克隆 .....	41
3.2.6 Schi4 基因的克隆 .....	44
3.3 锯缘青蟹几丁质酶 18 家族的生物信息学分析 .....	46
3.3.1 功能区的初步搜索 .....	46
3.3.2 一级结构预测 .....	48
3.3.3 高级结构预测 .....	48
3.3.4 锯缘青蟹几丁质酶 18 家族的同源性比对和进化分析 .....	50
3.3.4.1 序列同源性比对 .....	50
3.3.4.2 甲壳纲几丁质酶催化活性中心比对 .....	55
3.3.4.3 甲壳纲几丁质结合区比对 .....	57
3.3.4.4 甲壳动物系统进化树分析 .....	58
3.4 锯缘青蟹几丁质酶基因的组织分布 .....	59
3.4.1 引物设计 .....	59
3.4.2 溶解曲线 .....	59
3.4.3 相对定量分析 .....	61
3.5 Schi3 (Schie) 基因在大肠杆菌中的表达 .....	64
3.5.1 大肠杆菌重组表达载体的构建和鉴定 .....	64
3.5.2 几丁质酶基因 Schie 在大肠杆菌中的融合表达 .....	65
3.5.3 以胶体几丁质酶为底物的酶活性测定 .....	68
4. 讨论 .....	69
4.1 未知基因的克隆 .....	69
4.2 信号肽分析 .....	70
4.3 基因组 DNA 的提取 .....	70

4.4 荧光 PCR 检测组织分布 .....	71
4.5 目的基因的原核表达和蛋白活性 .....	71
5.结论 .....	74
6.参考文献 .....	75
在学期间参与发表论文 .....	81
致谢 .....	82

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Contents

Abstract in Chinese .....	1
Abstract in English .....	2
Abbreviation .....	4
1. Introduction .....	5
1.1 General introduction of <i>Scylla serrata</i> .....	5
1.1.1 Morphological characteristics .....	5
1.1.2 Reproduction .....	5
1.1.3 Molting and growth .....	6
1.1.4 The breeding situation and present problems of <i>Scylla serrata</i> .....	7
1.2 Chitin and Chitinase .....	8
1.2.1 The classification of chitinase .....	9
1.2.2 Super secondary structure of chitinase .....	10
1.2.2.1 The catalytic domain of chitinase .....	10
1.2.2.2 Chitin binding domain .....	10
1.2.2.3 Fn III domain .....	11
1.2.2.4 Cadherin-like domain .....	12
1.2.3 Three dimensional structure of chitinase .....	12
1.2.4 Function and application of chitinase .....	12
1.2.5 The reseach status of chitinase from Crustacea .....	14
1.3 Significance and contents of the reseach .....	15
2. Material and methods .....	17
2.1 Materials and reagents .....	17
2.1.1 Experimental animals .....	17
2.1.2 Strains and plasmids .....	17
2.1.3 Commonly used medium .....	17
2.1.4 Preparation of commonly used solution .....	17
2.2 Instruments .....	20



2.3 Methods.....	21
2.3.1 Genomic DNA extraction from <i>scylla serrata</i> .....	21
2.3.2 Molecular Cloning of <i>Scylla serrata</i> chitinase.....	21
2.3.2.1 Total RNA extraction .....	21
2.3.2.2 EST search.....	22
2.3.2.3 Primer design.....	22
2.3.2.4 Obtaining the chitinase-specific cDNA fragment .....	22
2.3.2.5 Protocol of 3' RACE.....	23
2.3.2.6 Amplification of the 5' ends by inverse PCR.....	24
2.3.2.7 Observation and purification of target fragment.....	26
2.3.2.8 Ligation of target fragment and pMD-18T.....	26
2.3.2.9 Transformation .....	26
2.3.2.10 Identification of the recombinant.....	26
2.3.2.11 Determination and analysis of nucleotide sequences .....	26
2.3.2.12 Analysis of the deduced amino acid sequence and prediction of protein structure.....	26
2.3.2.13 Construction of the phylogenetic tree of crustacean chitinases .....	26
2.3.3 Tissue distribution analysis by Real-time PCR.....	27
2.3.3.1 Selection of <i>Scylla serrata</i> and tissue isolation.....	27
2.3.3.2 Real-time PCR.....	27
2.3.4 Expression of Schi3 cDNA in <i>E. coli</i> expression system.....	28
2.3.4.1 Amplification of the ORF cDNA sequence of Schi3 .....	29
2.3.4.2 Enzymes digestion of PCR products and expression vector.....	29
2.3.4.3 Construction of <i>E. coli</i> expression vector .....	29
2.3.4.4 Induction expression of Schi3 in <i>E. coli</i> expression system .....	31
2.3.4.5 SDS-PAGE analysis .....	31
2.3.4.6 Renaturation of inclusion bodies by dialysis.....	31
2.3.4.7 Purification of the fusion protein by Ni-NTA His.Bind Resin .....	32
2.3.4.8 Chitinase activity assay using colloid chitin as substrate.....	32

3. Results .....	33
3.1 Genomic DNA extraction from <i>Scylla serrata</i> .....	33
3.2 Cloning of the GH18 chitinase of <i>Scylla serrata</i> .....	33
3.2.1 Known GH18 family information of Crustacea.....	33
3.2.2 Total RNA extraction from <i>Scylla serrata</i> .....	34
3.2.3 Cloning of Schi1.....	34
3.2.4 Cloning of Schi2.....	37
3.2.5 Cloning of Schi3.....	41
3.2.6 Cloning of Schi4.....	44
3.3 Bioinformatics of the GH18 chitinase of <i>Scylla serrata</i> .....	46
3.3.1 Preliminary search of the function region.....	46
3.3.2 Primary structure prediction.....	48
3.3.3 Tertiary structure prediction.....	48
3.3.4 Homologous comparison and evolution analysis of the GH18 chitinase of <i>Scylla serrata</i> .....	50
3.3.4.1 Sequence homologous comparison .....	50
3.3.4.2 Comparison of crustacean active chitinase catalytic center .....	55
3.3.4.3 Comparison of the CBD domains in crustacean chitinases.....	57
3.3.4.4 Construction of the Phylogenetic tree of crustacean chitinases .....	58
3.4 Tissue distribution of the chitinases of <i>Scylla serrata</i> .....	59
3.4.1 Primer design.....	59
3.4.2 Dissolved curves .....	59
3.4.3 Relative quantitative analysis.....	61
3.5 Expression of Schi3 (Schie) cDNA in <i>E. coli</i> .....	64
3.5.1 Construction and identity of <i>E. coli</i> expression vector .....	64
3.5.2 Fusion expression of Schie in <i>E. coli</i> .....	65
3.5.3 Chitinase activity assay using colloid chitin as substrate.....	68
4. Discusson.....	69
4.1 Cloning of unknown genes.....	69

4.2 Analysis of signal peptide .....	70
4.3 Extraction of genomic DNA .....	70
4.4 Tissue distribution .....	71
4.5 Prokaryotic expression of target gene and protein activity .....	71
5. Conclusions .....	74
6. References .....	75
Publications.....	81
Acknowledgements.....	82

## 中文摘要

几丁质酶是甲壳动物周期性蜕皮过程的关键酶之一，甲壳动物几丁质酶均属于 18 家族几丁质酶。目前对甲壳纲几丁质酶的研究很少，主要集中在虾类，还未见对蟹类几丁质酶的报道。本文根据几丁质酶基因的保守序列设计引物，运用反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 方法从锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 的肝胰腺和鳃中扩增得到部分几丁质酶编码序列，进一步结合 RACE 法和反向 PCR 法，克隆得到了锯缘青蟹的 4 个几丁质酶基因，将其命名为 Schi1、Schi2、Schi3 和 Schi4。它们均具有几丁质酶 18 家族催化活性区，其中 Schi1、Schi2 和 Schi3 分别含有一个几丁质二型结合区。此外，Schi1 和 Schi3 含有信号肽序列，Schi2 不含信号肽区。它们的 Genbank 获取号分别为：EU883590.1, GU168777.1, EU402970.1 和 GU168778.1。

通过这 4 个基因的氨基酸序列与甲壳纲已知几丁质酶比对发现，甲壳纲 18 家族几丁质酶催化活性中心氨基酸序列非常保守。几丁质结合域含有 6 个高度保守的半胱氨酸残基，形成 3 对二硫键，可能对结合域具有结构支撑作用。结合域中还包含保守的疏水氨基酸残基，主要是酪氨酸残基 (Y) 和色氨酸 (W) 残基，少量为苯丙氨酸残基 (F)。系统发生树显示，Schi1, Schi2 和 Schi3 基因分别与组 1, 组 2 和组 3 的虾类几丁质酶基因关系最为密切，可以归入这 3 个组中。而 Schi4 基因与其它 3 组相比，处于相对独立的分支。

采用 SYBR 荧光定量 PCR 分析这 4 个几丁质酶基因在锯缘青蟹肝胰腺、胃、肠、眼柄、内壳膜、心脏、鳃、肌肉和血淋巴等 9 个组织的表达情况。结果显示这些基因具有组织特异性，Schi1 基因主要在肝胰腺中表达，功能可能是降解含几丁质的食物和内源性的几丁质。Schi2 基因在内表皮的表达量很低。Schi3 基因只在肝胰腺中表达，显示了组织专一性，可能也是与消化有关。此外，Schi1, Schi2 和 Schi4 基因都在鳃中高表达。

我们将 Schi3 基因构建入原核载体 pET-28a，转化大肠杆菌 BL21 (DE3)，在 0.5 mmol/L 的 IPTG，30 °C 下诱导，使得融合蛋白以可溶的形式在细胞质中表达，并通过超声破碎菌体释放到上清中。通过亲和层析纯化后的目的蛋白大小为 55 KDa 左右，与理论预计大小相符。但是用 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 比色定还原糖法并没有检测到几丁质酶活性，可能还需要进一步改进实验条件或考虑更换真核表达系统。

**关键词：**锯缘青蟹；几丁质酶；基因克隆；生物信息学；组织分布；蛋白表达

## Abstract

Chitinase is the key enzyme during the molting of Crustacea. Crustacean chitinases belong to glycoside hydrolase 18 (GH18) family of chitinases. Data about crustacean chitinases are rather limited and mainly focus on shrimps. There is no reports on chitinase of crabs. Primers were designed according to the conserved nucleotide sequences of crustacean chitinases and used to clone partial *Scylla serrata* chitinase cDNA by RT-PCR methods. Then, RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) technology and inverse PCR were used to identify 4 chitinases of *Scylla serrata*. We named them as Schi1, Schi2, Schi3 and Schi4. All of them had chitinases family 18 catalytic domain, and Schi1, Schi2 and Schi3 had a chitin binding type-2 domain, respectively. In addition, Schi1 and Schi3 had signal peptide, but the typical signal sequence was not found at the N-terminus of the Schi2 sequence. Their Genbank accession numbers were EU883590.1, GU168777.1, EU402970.1 and GU168778.1.

We compared the amino acid sequences among these 4 chitinases and other known chitinases of Crustacea. The result indicated that the amino acid sequences in the catalytic active site of Crustacea were highly conserved. And six cysteine residues in the chitin binding domains (CBDs) were all conserved in the crustacean chitinase family. They formed three internal disulfide linkages for maintaining the structural stability. CBDs bind to insoluble chitin via highly conserved aromatic residues. They were mainly tyrosine and tryptophan, fewer were phenylalanine. Phylogenetic tree showed that Schi1, Schi2 and Schi3 could be branched into the known three groups of shrimps. Besides the already known three groups, Schi4 should be branched into a relative independent clades.

Tissue distribution was investigated in nine tissues by SYBR real-time RT-PCR. Results showed different tissue specificity. Schi1 was mainly expressed in hepatopancreas. It may function in the digestion of chitin containing food and in the degradation of endogenous chitin in the gut. The expression level of Schi2 was very low in cuticular. Schi3 was a hepatopancreas-specific gene, and it may also related to digestion. In addition, Schi1, Schi2 and Schi4 were highly expressed in gill.

Schi3 was cloned into prokaryotic vector pET-28a, and transformed into *E. coli* BL21 (DE3), and then expressed by the induction of 0.5 mmol/L IPTG at 30 °C. The fusion protein is expressed in the cytoplasm as a soluble form, and released into the supernatant by sonication. A specific 55 KDa recombinant protein was produced and by Ni-NTA His.Bind Resin, which is almost the same with the theoretical prediction. But the chitinase activity was not detected by 3, 5- dinitrosalicylic Acid (DNS) method. We should further improve the

experiment conditions, or use eukaryotic expression system.

**Key words:** *Scylla serrata*; chitinase; gene cloning; bioinformatics; tissue distribution; protein expression

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
DNase I	Deoxyribonuclease I	脱氧核糖核酸酶
RNase A	Ribonuclease A	核糖核酸酶A
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
Kan	Kanamycin	卡那霉素
TIM	Triosephosphate isomerase	丙糖磷酸异构酶
DNS	3,5-dinitrosalicylic	3, 5-二硝基水杨酸
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol	$\beta$ -巯基乙醇
EB	ethidium bromide	溴化乙锭
RT-PCR	reverse transcription PCR	反转录PCR
AP	ammonium persulfate	过硫酸铵
EST	expressed sequence tag	表达序列标签
DEPC	diethylpyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
ORF	open reading frame	开放阅读框
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside	异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷
TEMED	N',N',N',N'-tetramethylethylene diamine	N',N',N',N'-四甲基乙二胺
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳

## 1. 引言

### 1.1 锯缘青蟹的概况

锯缘青蟹 (*Scylla serrata*), 俗名叫𫶂; 台湾、福建叫红𫶂 (雌), 菜𫶂 (雄); 广东称膏蟹; 菲律宾称泥蟹。分类学上隶属于节肢动物门 (Arthropoda)、甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda)、梭子蟹科 (Portunidae)、青蟹属 (*Scylla*)。广布于印度-西太平洋



热带、亚热带海域, 包括中国东南沿海、日本、越南、泰国、菲律宾、印度尼西亚、夏威夷、澳大利亚、新西兰以及非洲东南部与红海。《本草纲目》中记载: “𫶂, 海底爬行类, 其肉鲜白, 具有健肾壮腰、养心补脾之功, 配以党参、桂圆, 药效更佳。”青蟹是一种味道鲜美、营养丰富的食用蟹。青蟹可食部分占体重 64%左右, 主要食用

部位中生殖腺 (卵巢) 含蛋白质高达 30.6%, 氨基酸含量丰富; 而肌肉中含丰富的不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸; 肝脏中还含丰富的 Ca 等矿物质。青蟹不但营养丰富, 肉味鲜美, 同时还具有药用价值, 有健身滋补功效, 其甲壳还可提取甲壳素, 壳聚糖, 几丁质, 饲用蛋白等<sup>[1]</sup>。另根据林琪等<sup>[2, 3]</sup>关于青蟹分类文献报道, 锯缘青蟹应定名为拟穴青蟹 (*Scylla paramamosian*), 本论文暂用锯缘青蟹命名。

#### 1.1.1 形态特征

青蟹甲略呈椭圆形, 甲壳背面基本上光滑, 有一些粒状小突起及白色斑点, 因体色青绿而得名。背面胃区与心区之间有明显的“H”形凹痕, 额具4个突出的三角形齿, 较内眼窝突出, 前侧缘有9枚中等大小的齿, 末齿小而锐突出, 指向前方。螯足粗壮, 座节前缘末端有1刺, 长节前缘有3刺, 后缘末部及末端各有1刺。腕节内缘具有1壮刺, 外缘圆弧形, 具2个壮刺, 大小相近。掌节有3个刺, 一个在腕节缝顶点前, 另两个并排在指节缝后, 两个刺均较发达。掌节靠指节基部的两个刺均发达。雄性腹部呈宽三角形, 雌性腹部呈圆形。种名 *serrata* 为锯齿的意思, 指其前侧缘和额缘的锯齿<sup>[2]</sup>。

#### 1.1.2 繁殖

青蟹繁殖季节主要与水温有关系。在水温 18 °C 以上, 其摄食、活动正常, 性腺开始发育, 一般的繁殖旺季是 3~6 月和 9~10 月。在天气炎热季节或低温, 盐度变化大时,



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库