

学校编码: 10384

分类号__密级__

学号: 21120051302170

UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

拟穴青蟹 HSP70、PDI 及 GnRH 受体的研究

Study of HSP70, PDI and GnRH receptor in *Scylla*

paramamosain

刘元婧

指导教师姓名: 叶海辉副教授

专 业 名 称: 海洋生物学

论文提交日期: 2008 年 7 月 17 日

论文答辩时间: 2008 年 月 日

学位授予日期: 2008 年 月 日

答辩委员会主席: 李少菁 教授、博导

评阅人: 李少菁 教授、博导

王艺磊 教授、硕导

2007 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密 (), 在年解密后适用本授权书。
2. 不保密 ()

作者签名: _____ 日期: _____ 年 _____ 月 _____ 日

导师签名: _____ 日期: _____ 年 _____ 月 _____ 日

目录	
缩略词中英文对照表	A-1
中文摘要	1
英文摘要	4
第一章 绪论	7
第一节 蛋白质折叠的难题	7
第二节 分子伴侣和热休克蛋白	8
2.1 分子伴侣概念的提出.....	8
2.2 热休克蛋白家族.....	9
第三节 折叠酶和蛋白质二硫键异构酶	11
3.1 折叠酶.....	11
3.2 蛋白二硫键异构酶 (PDI).....	12
3.3 二硫键异构酶的结构.....	12
3.4 二硫键异构酶的功能.....	12
第四节 促性腺激素释放激素受体	14
4.1 下丘脑-垂体-性腺轴 (HPG 轴).....	14
4.2 无脊椎动物 HPG 轴的研究进展.....	14
4.3 促性腺激素释放激素受体 (GnRH-R).....	15
第五节 技术路线、目的和意义	17
5.1 拟穴青蟹 HSP70 和 PDI 基因的研究.....	17
5.2 拟穴青蟹 GnRH-R 的研究.....	19
第二章 拟穴青蟹 HSP70 基因的克隆和表达研究	21
第一节 材料与仪器	21
1.1 材料.....	21
1.2 主要仪器.....	23
第二节 实验方法	23
2.1 拟穴青蟹 HSP70 基因片段的获得.....	23

2.2 拟穴青蟹 HSP70 cDNA 全长的获得.....	25
2.3 PCR 产物回收和纯化	28
2.4 回收片段的克隆与测序.....	29
2.5 生物信息学软件分析.....	32
2.6 HSP70 半定量 RT-PCR 分析.....	32
第三节 结果	34
3.1 基因组 DNA 的提取	34
3.2 以基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增结果	34
3.3 总 RNA 的提取	35
3.4 拟穴青蟹 HSP70 基因 3'RACE 和 5'RACE 结果.....	37
3.5 拟穴青蟹 HSP70 全长 cDNA 序列.....	38
3.6 拟穴青蟹 HSP70 序列同源性分析	40
3.7 半定量 RT-PCR 检测 HSP70 基因在拟穴青蟹各组织器官中的表达	45
第四节 讨论	45
4.1 拟穴青蟹 HSP70 符合 HSP70 家族结构特征和保守性规律	45
4.2 拟穴青蟹 HSP70 与其他物种同源蛋白相比具有很高相似率.....	45
4.3 拟穴青蟹 HSP70 的表达分布特征	46
第三章 拟穴青蟹 PDI 基因的克隆和表达研究	47
第一节 材料与仪器	47
1.1 材料	47
1.2 主要仪器.....	49
第二节 实验方法	49
2.1 拟穴青蟹 PDI cDNA 全长的获得	49
2.2 PCR 产物回收和纯化	52
2.3 回收片段的克隆与测序.....	52
2.4 生物信息学软件分析.....	52
2.5 PDI 半定量 RT-PCR 分析.....	52
2.6 拟穴青蟹 PDI 的 Western blot 检测	53
第三节 结果	55

3.1 拟穴青蟹 PDI 基因 3'RACE 和 5'RACE 结果.....	55
3.2 拟穴青蟹 PDI 全长 cDNA 序列	57
3.3 拟穴青蟹 PDI 序列同源性分析.....	59
3.4 半定量 RT-PCR 检测 PDI 基因在拟穴青蟹各组织器官中的表达	62
3.5 拟穴青蟹 PDI 抗体的获得.....	65
第四节 讨论	65
4.1 拟穴青蟹 PDI 符合 PDI 家族结构特征和保守性规律	65
4.2 拟穴青蟹 PDI 与其他物种同源蛋白相比相似率不高.....	66
4.3 拟穴青蟹 PDI 的表达分布特征.....	66
第四章 拟穴青蟹 GnRH-R 研究	68
第一节 材料与仪器	68
1.1 材料	68
1.2 主要仪器.....	70
第二节 实验方法	70
2.1 蛋白样品的准备.....	70
2.2 拟穴青蟹 GnRH-R 的 Western blot 检测.....	71
2.3 免疫共沉淀.....	71
2.4 免疫共沉淀后 Western blot.....	73
2.5 免疫共沉淀产物的质谱鉴定	74
第三节 结果	75
3.1 蛋白样品的准备.....	75
3.2 拟穴青蟹 GnRH-R 的 Western blot 检测.....	77
3.3 免疫共沉淀银染结果	79
3.4 免疫共沉淀后 Western blot 检测.....	81
3.5 串联质谱检测结果.....	82
第四节 讨论	88
结语	91
参考文献	94

在学期间参加的科研项目及成果..... 100

致谢..... 101

厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENTS

Lists of abbreviation	A-1
Abstract in Chinese	1
Abstract in English	4
Chapter 1 Introduction	7
Section 1 Puzzle in protein folding	7
Section 2 Molecular chaperones and heat shock proteins	8
2.1 Concept of molecular chaperones	8
2.2 Heat shock protein family	9
Section 3 Folding enzymes and protein disulfide isomerase	11
3.1 Folding enzymes	11
3.2 Protein disulfide isomerase (PDI).....	12
3.3 Molecular structure of PDI.....	12
3.4 Function of PDI.....	12
Section 4 Gonadotropin-releasing hormone receptor	14
4.1 Hypothalamic–pituitary–gonadal axis (HPG axis)	14
4.2 Advances of HPG axis research in invertebrate.....	14
4.3 Gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRH-R)	15
Section 5 Technical proposal, Aims and significance of this study	17
5.1 Study on HSP70 and PDI in <i>S. paramamosain</i>	17
5.2 Study on GnRH-R in <i>S. paramamosain</i>	19
Chapter 2 Gene cloning and expression study of <i>S. paramamosain</i>	
HSP70	21
Section 1 Materials and equipments	21
1.1 Materials	21
1.2 Equipments	23
Section 2 Methods	23

2.1 Genomic DNA fragment of <i>S. paramamosain</i> HSP70.....	23
2.2 Full-length cDNA sequence of <i>S. paramamosain</i> HSP70.....	25
2.3 Purification of PCR products.....	28
2.4 Gene cloning and sequencing.....	29
2.5 Bioinformatics softwares.....	32
2.6 RT-PCR analysis of <i>S. paramamosain</i> HSP70.....	32
Section 3 Results	34
3.1 Extraction of genomic DNA of <i>S. paramamosain</i>	34
3.2 Results of PCR amplification using genomic DNA as a template.....	34
3.3 Extraction of total RNA.....	35
3.4 Results of rapid amplification of cDNA ends.....	37
3.5 Full-length cDNA sequence of <i>S. paramamosain</i> HSP70.....	38
3.6 Amino acid sequence alignment of HSP70.....	40
3.7 HSP70 expressions in tissues and organs.....	45
Section 4 Discussions	45
4.1 <i>S. paramamosain</i> HSP70 meets the structural and conservatism feature of HSP70 family.....	45
4.2 High identity of HSP70 between species.....	45
4.3 Feature of HSP70 expression in <i>S. paramamosain</i>	46
Chapter 3 Gene cloning and expression study of <i>S. paramamosain</i> PDI	47
Section 1 Materials and equipments	47
1.1 Materials.....	47
1.2 Equipments.....	49
Section 2 Methods	49
2.1 Full-length cDNA sequence of <i>S. paramamosain</i> PDI.....	49
2.2 Purification of PCR products.....	52
2.3 Gene cloning and sequencing.....	52
2.4 Bioinformatics softwares.....	52

2.5 RT-PCR analysis of <i>S. paramamosain</i> PDI	52
2.6 Western blot analysis of <i>S. paramamosain</i> PDI	53
Section 3 Results	55
3.1 Results of rapid amplification of cDNA ends	55
3.2 Full-length cDNA sequence of <i>S. paramamosain</i> PDI	57
3.3 Amino acid sequence alignment of PDI	59
3.4 PDI expressions in tissues and organs	62
3.5 Obtainment of <i>S. paramamosain</i> PDI antibody	65
Section 4 Discussions	65
4.1 <i>S. paramamosain</i> PDI meets the structural and conservatism feature of PDI family	65
4.2 Low identity of PDI between species.....	66
4.3 Feature of PDI expression in <i>S. paramamosain</i>	66
Chapter 4 Study of <i>S. paramamosain</i> GnRH-R	68
Section 1 Materials and equipments	68
1.1 Materials	68
1.2 Equipments	70
Section 2 Methods	70
2.1 Extraction of total Protein	70
2.2 Western blot analysis of <i>S. paramamosain</i> GnRH-R.....	71
2.3 Co-immunoprecipitation reaction.....	71
2.4 Post-immunoprecipitation Western blot	73
2.5 Mass spectrum identification of Co-immunoprecipitation products	74
Section 3 Results	75
3.1 Extraction of genomic total Protein	75
3.2 Western blot analysis of <i>S. paramamosain</i> GnRH-R.....	77
3.3 Co-immunoprecipitation results	79
3.4 Post-immunoprecipitation Western blot	81
3.5 Mass spectrum identification results	82

Section 4 Discussions	88
Summary	91
References	94
Research projects involved and achievements obtained in the period of master degree study	100
Acknowledgements	101

厦门大学博硕士论文摘要库

缩略词中英文对照表

缩略词	英文	中文
ACN	Acetonitrile	乙腈
ADP	Adenosine diphosphate	腺苷二磷酸
Ala (A)	Alanine	丙氨酸
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
Arg (R)	Arginine	精氨酸
Asn (N)	Asparagine	天冬酰胺
Asp (D)	Aspartic acid	天冬氨酸
ATP	Adenosine triphosphate	三磷酸腺苷
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	基本局域联配搜寻工具
bp	Base pair	碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
Cys (C)	Cysteine	半胱氨酸
Da	Dalton	道尔顿
DAB	3,3'-diaminobenzidine	二氨基联苯胺
ddH ₂ O	Double distilled water	双蒸水
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dNTPs	Deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲亚砜
DTT	Dithiothreitol	二巯苏糖醇
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	已二胺四乙酸
ER	Endoplasmic reticulum	内质网
FSH	Follicle-stimulating hormone	卵泡刺激素

Gln (Q)	Glutamine	谷氨酰胺
Glu (E)	Glutamic acid	谷氨酸
Gly (G)	Glycine	甘氨酸
GnRH	Gonadotropinreleasing- hormone	促性腺激素释放激素
GnRH-R	Gonadotropinreleasing- hormone receptor	促性腺激素释放激素受体
GRP	Glucoseregulated protein	葡萄糖调节蛋白
GTH	Gonadotropic hormone	促性腺激素
HCCA	α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid	α -氰基-4-羟基肉桂酸
His (H)	Histidine	组氨酸
HPG axis	Hypothalamic-pituitary-gonadal axis	下丘脑-垂体-性腺轴
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HSP	Heat shock protein	热休克蛋白
Ile (I)	Isoleucine	异亮氨酸
LB	Luria-Bertani medium	大肠杆菌培养基
Leu (L)	Leucine	亮氨酸
LH	Luteotrophic hormone	黄体生成素
Lys (K)	Lysine	赖氨酸
Met (M)	Methionine	甲硫氨酸
mRNA	Messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
MS	Spectrometry Mass	质谱
NCBI	National Center for Biotechnology Information	美国国家生物信息中心
OD	Optical density	光密度
ORF	Open reading frame	开放阅读框
PAGE	Polyacrylanide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺电泳
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PDI	Protein disulfide isomerase	蛋白质二硫键异构酶

Phe (F)	Phenylalanine	苯丙氨酸
pI	Isoelectric point	等电点
PMF	Peptide mapping fingerprint	蛋白质肽指纹谱
PPI	Peptidyl prolyl isomerase	肽基脯氨酸异构酶
Pro (P)	Proline	脯氨酸
PVDF	Polyvinylidene difluoride	聚偏(二)氟乙烯
RACE	Rapid amplification of cDNA ends	快速扩增 cDNA 末端
rpm	Revolutions per minute	每分钟转数
RT	Reverse transcription	反转录
Rubisco	Ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase	1, 5-二磷酸羧化酶-加氧酶
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
Ser (S)	Serine	丝氨酸
SH	Sulfhydryl group	巯基
sHSP	Small Heat shock protein	小分子量热休克蛋白
TAE	Tris-acetic acid-EDTA buffer	Tris-乙酸 EDTA 缓冲液
TCP-1	T complex polypeptide-1	T 多肽聚合物 1
TFA	Trifluoroacetic acid	三氟乙酸
Thr (T)	Threonine	苏氨酸
Tris	Tris hydroxymethyl aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
Tm	Melting temperature	退火温度
Trp (W)	Tryptophan	色氨酸
Tyr (Y)	Tyrosine	酪氨酸
UTR	Untranslated region	非翻译区
Val (V)	Valine	缬氨酸

摘要

拟穴青蟹 *Scylla paramamosain* (Estampador, 1949) 是我国东南沿海4种青蟹中的主要优势种, 重要的海洋经济蟹类之一。本研究采用分子生物学和免疫学技术对拟穴青蟹的一些功能蛋白——热休克蛋白70 (heat shock protein 70, HSP70)、蛋白质二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase, PDI) 和促性腺激素释放激素受体 (gonadotropin-releasing hormone receptor, GnRH-R) 进行研究, 旨在证明这些蛋白在拟穴青蟹体内的存在, 了解其分子结构和分布, 为拟穴青蟹生殖调控机制的研究以及水产养殖的发展提供基础资料。所涉及的研究内容可分为以下两个部分:

第一部分 拟穴青蟹分子伴侣和折叠酶的分子克隆和表达的研究

运用分子生物学技术, 对分子伴侣中最保守的成员——HSP70以及迄今发现的两种折叠酶之一——PDI进行研究, 结果如下:

1、获得拟穴青蟹 HSP70 和 PDI 全长 cDNA 序列

利用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 和基因克隆等分子生物学技术, 首次在青蟹属发现 HSP70 和 PDI, 并测定了拟穴青蟹 HSP70 和 PDI 全长 cDNA 序列, 推导出其氨基酸序列, 结果已登录 GeneBank, 登录号为 EU754021 和 EU679503。

拟穴青蟹 HSP70 cDNA 序列全长共 2,189bp, 包括完整的 5'非翻译区、开放阅读框以及 3'非翻译区。其中开放阅读框位于 111bp-2,063bp 区域, 共编码 650 个氨基酸, 总分子量约为 71.2kDa, 理论等电点为 5.38。

拟穴青蟹 PDI cDNA 序列全长 2,004bp, 包括完整的 5'非翻译区、开放阅读框以及 3'非翻译区, 其中开放阅读框位于 97bp-1,549bp 区域, 推导出前体肽含有 483 个氨基酸, 由最前端 19 个氨基酸的信号肽和余下的 464 个氨基酸的成熟肽组成。拟穴青蟹 PDI 成熟肽总分子量约为 51.9kDa, 理论等电点为 5.24。

2、拟穴青蟹 HSP70 和 PDI 与同源蛋白的比较

拟穴青蟹 HSP70 序列与果蝇、斑马鱼、非洲爪蟾、家鼠和人的相似性分别为 83.1%、82.3%、86.4%、81.1%和 81.2%, 可见 HSP70 基因具有很高的遗传保守性, 由 HSP70 氨基酸序列绘制的甲壳纲分子系统树基本能够反映出各物种间进化关系。而 PDI 基因的遗传保守性不高, 它与果蝇, 斑马鱼, 非洲爪蟾, 家鼠,

和人的相似率分别为（27.6%，31.0%，28.9%，29.8%和 25.8%），根据 PDI 氨基酸序列绘制的节肢动物门分子系统树不能反映物种间的亲缘关系。

3、HSP70 和 PDI 在拟穴青蟹各组织器官的表达

运用半定量 RT-PCR 技术，分别检测了发育期雌性拟穴青蟹的八个不同组织器官——脑、胸神经团、眼柄、卵巢、肝胰腺、心脏、肌肉和胃中 HSP70 和 PDI 的转录表达情况。结果显示：在这八个组织器官中均成功扩增得到 HSP70 和 PDI 预期产物，说明这两个基因可以在拟穴青蟹组成型表达。其中，HSP70 在卵巢中表达量最高，为 β -Actin 表达量的 1.86 倍，其次为脑，表达量为 β -Actin 的 1.56 倍。在眼柄和肌肉组织中的表达量最低约为 β -Actin 基因的一半。PDI 亦在卵巢中表达量最高，为 β -Actin 表达量的 1.06 倍，在胃和眼柄表达量最低，仅为 β -Actin 表达量的 1/5 左右。

HSP70 和 PDI 在拟穴青蟹卵巢中以及 HSP70 在脑中的高表达量暗示了这两种蛋白也许与拟穴青蟹的生殖发育有关。

第二部分 拟穴青蟹 GnRH-R 的初步研究

利用免疫印迹（Western blot）和免疫共沉淀（Co-Immunoprecipitation）等技术研究了拟穴青蟹与外源促性腺激素释放激素受体的抗体结合的抗原及其相互作用的蛋白，结果如下：

1、三种 GnRH-R 抗体在拟穴青蟹神经生殖系统中的 Western blot 检测

用兔抗人、兔抗果蝇和兔抗海鞘的 GnRH-R 抗体分别对拟穴青蟹脑、胸神经团、眼柄和精巢进行 Western blot 检测。结果显示在各组织器官中共有的免疫阳性条带在分子量 45-55kDa 范围之间。除眼柄外其它组织器官免疫结果还有其它免疫阳性条带的存在：脑和胸神经团中另有一条 36kDa 左右带；在性腺中的不同抗体免疫结果有一定的差异，其中兔抗人和果蝇抗体免疫结果有一条 28kDa 左右条带，而兔抗海鞘抗体免疫结果显示性腺中不仅有 28kDa 的条带还有跟脑与胸神经团一致的约为 36kDa 的条带以及一条 30kDa 的条带。

2、外源 GnRH-R 抗体对拟穴青蟹胸神经团和性腺的免疫共沉淀反应

利用免疫共沉淀技术，分离出拟穴青蟹与外源 GnRH-R 抗体结合的两抗原，为拟穴青蟹 GnRH-R 的存在提供证据。有趣的是这两种抗原的分子量分别与哺乳动物和非哺乳动物 GnRH-R 的分子量大小接近，分别为 38.1kDa 和 54.0kDa。

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 for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库