

doi: 10.7541/2023.2022.0038

池蝶蚌*HsPif*基因的克隆及表达分析

熊雅萍^{1,2} 马慧妹^{1,2} 胡蓓娟^{1,2} 邱齐骏³ 洪一江^{1,2}

(1. 南昌大学生命科学学院, 南昌 330031; 2. 江西省水产动物资源与利用重点实验室, 南昌 330031;
3. 抚州市水产科学研究所, 抚州 334000)

摘要: 为了探究池蝶蚌(*Hyriopsis schlegelii*)酸性基质蛋白*Pif*基因的基本功能, 研究通过RACE-PCR技术首次在池蝶蚌中获得了*Pif*基因的cDNA全长序列, 命名为*HsPif*, 其全长为3457 bp, 5'端非翻译区(5'UTR)为485 bp, 3'端非翻译区(3'UTR)为363 bp, 开放阅读框(ORF)3072 bp, 共编码1023个氨基酸, 生物信息学分析结果显示*HsPif*蛋白含有一个von-Willebrand因子A型结构域和三个几丁质结合结构域; 氨基酸组成成分结果表明天冬氨酸含量最高, 组氨酸含量最低; *HsPif*蛋白亲水指数为-0.566, 为亲水蛋白。构建系统进化树分析显示*Pif*基因保守性较高, 与三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)*Pif*相似度最高, 且与其他贝类在同一个大支上。组织荧光定量PCR结果表明: *HsPif*基因主要在外套膜中表达; 分子原位杂交显示杂交反应主要在外套膜上皮细胞发生。进行植核手术后进行qPCR检测*HsPif*基因的表达量变化, 实验结果表明, *HsPif*基因可能与珍珠层的分泌有关, 有助于进一步了解珍珠形成的机制, 为珍珠养殖提供参考。

关键词: *HsPif*; 基因克隆; 原位杂交; 植核; 组织表达; 珍珠囊; 池蝶蚌

中图分类号: Q344⁺.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2023)02-0339-06



软体动物是海洋生物中最大、物种最丰富的门之一^[1]。几个世纪以来, 软体动物贝壳的进化起源、结构、模式和物理性质一直是科学家关注的焦点。而贝壳是由95%—99%的碳酸钙晶体和少于5%的有机质物质(如蛋白质、糖蛋白、多糖和脂类)组成的多层结构(棱柱层和珍珠层), 由贝类外套膜分泌的有机质基质和碳酸钙晶体结合而成, 珍珠是倒转过来的贝壳^[2, 3]。Cuif等^[4]在对珍珠的结构观察后发现, 棱柱层位于珍珠核部分, 珍珠层在外部, 碳酸钙和不同的基质蛋白形成不同的结晶, 其中棱柱层由方解石晶体构成, 珍珠层由文石晶体构成。外套膜分泌的有机质基质在碳酸钙生物矿化中具有奇特的调节作用^[5], 且珍珠层具有有序规则的平面隔室结构, 几乎每个隔室中的文石晶体都垂直珍珠层平面的C轴方向^[6], 虽然对珍珠形成的研究颇多^[7-9], 但具体调控过程仍不清楚。

珍珠形成过程从中参与珍珠质形成的基因有很多, 包括*PIF*、*MSI60*和*Pearlin*等^[9]。其中, *Pif*是一种

酸性基质蛋白, 是珍珠形成的关键大分子, 参与文石的形成、珍珠层中文石片的结晶和随后的堆积^[10, 11]。Suzuki等^[7]发现在合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)中*Pif* cDNA编码一个前体蛋白, 经翻译后裂解生成*Pif* 97和*Pif* 80。*Pif* 97具有两个保守的功能域, 即血管性血友病因子A型(VWA)域和几丁质结合域, 它们可以结合几丁质微纤维并与其他蛋白质相互作用, 而*Pif* 80具有一些文石结合活性^[7]。含有VWA蛋白质的相互作用调节功能可能是形成贝壳基质蛋白复合物的关键机制^[12], 而*Pif*基因同时具有VWA结构域和几丁质结合域共同作用, 可以将*Pif*97和*Pif*80、N16等其他与珍珠层形成相关的蛋白相互结合排列沉积, 从而形成有机框架, 并形成层状珍珠层^[13]。有研究表明*Pif*除了与珍珠层的形成有关外, 该基因的表达水平跟分泌珍珠质的速率密切相关^[14]。池蝶蚌中缺乏对*Pif*基因的研究, 影响了我们对池蝶蚌中*Pif*基因在形成珍珠过程中其功能的理解。

池蝶蚌(*Hyriopsis schlegelii*)是一种淡水育珠

收稿日期: 2022-01-25; 修订日期: 2022-04-01

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0901400); 国家现代农业产业技术体系资助 [Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901400); China Agriculture Research System of MOF and MARA]

作者简介: 熊雅萍(1995—), 女, 硕士; 主要从事贝类养殖研究。E-mail: 2675718552@qq.com

通信作者: 洪一江(1963—), 男, 博士, 教授, 博士生导师; 主要从事遗传育种研究。E-mail: yjhong@163.com

蚌,具有生长快、外套膜厚、抗病能力强等特点,所产珍珠优珠率高,是我国主要的淡水育珠蚌之一^[15]。目前关于池螺蚌育珠机制研究较少,本实验通过对池螺蚌中的*Pif*基因进行分子全长的克隆和其表达分析,探讨*HsPif*的序列特征及其相关功能,为今后池螺蚌的养殖与育珠提供更多科学参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验中所用未进行植核的、张闭有力的3龄健康池螺蚌取自江西省抚州市水产科学研究所国家级池螺蚌良种场,从良种场取回后放入已曝气的水箱中暂养1周,以适应新环境,每2天换1次水。植核池螺蚌取自于江西万年夏清华珠宝有限公司。

1.2 总RNA的提取和cDNA的合成

以TRIzol提取法从池螺蚌的外套膜中提取总RNA,用于qPCR的RNA则需从池螺蚌的10个组织获得,10个组织分别为血细胞、性腺、肝胰腺、肾脏、鳃、闭壳肌、外套膜、斧足、肠道和心脏;根据Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa)试剂盒说明书要求合成qPCR所需的cDNA模板。

1.3 *HsPif*基因的全长克隆和测序

根据高通量转录组测序数据中筛选出*HsPif*基因的部分片段,利用Primer 5.0设计中间片段扩增引物(F:5'-CAATGTCTCTCTGTCTCAAT-3'; R:5'-ATTCCAAGATTCAACTCCGT-3')。随后用各组织模板进行PCR扩增,琼脂凝胶电泳检测后,按照DNA回收试剂盒(OMEGA)说明书进行切胶回收,将得到的产物与pMD19-T载体连接,于含Apm⁺培养基中培养,送至上海生物工程有限公司测序。比对分析获得*HsPif*基因中间序列,再根据该序列设计RACE-PCR引物(5'-RACE 1: 5'-CGGTGAGAACAATTCCAATCTG-3'; 5'-RACE 2: 5'-AGACTCCGTAATCCAAGATAAG-3'; 3'-RACE1: 5'-AATTCGCTTGTGTCTGTCTTCG-3'; 3'-RACE 2: 5'-GCCGAGTCATCAAGTTCAGACG-3')。根据SMARTer® RACE 5'/3' Kit User Manual试剂盒的要求合成*HsPif*基因5'端和3'端序列,再与*HsPif*基因中间序列进行拼接,从而获得*HsPif*基因全长cDNA序列。

1.4 生物信息学分析

生物信息学在线工具分析池螺蚌*HsPif*基因,使用Clustal W1.81进行氨基酸序列的比对,NCBI(ORF finder, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)上查找开放阅读框,分析蛋白结构,推导氨基酸序列和比对氨基酸同源性。系统进化树用软件MEGA7.0中的NJ法构建。

1.5 池螺蚌各组织中*HsPif*的表达分析

分别提取池螺蚌血细胞、性腺、肝胰腺、肾脏、鳃、闭壳肌、外套膜、斧足、肠道和心脏10个组织的总RNA,按照PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa)试剂盒说明书将所提RNA反转录为cDNA。根据获得的池螺蚌*HsPif*基因设计荧光定量引物(F: 5'-CAATGTCTCTCTGTCTCAAT-3'; R: 5'-ATTCCAAGATTCAACTCCGT-3'),以池螺蚌β-actin(F: 5'-AAGGTTACGCCCTTCCTCAT-3'; R: 5'-GCCATTCCTGCTCAAAGTC-3')内参基因,进行荧光定量PCR(qPCR)反应检测*HsPif*基因在10个不同组织中的表达水平。数据处理采用2^{-ΔΔC_t}方法,利用Excel和GraphPad Prism 8.3.0分析作图。

1.6 珍珠囊形成过程中*HsPif*的表达分析

筛选张口有力、个体差异小的健康2龄池螺蚌进行植核手术,挑选大小、重量差异较小的由贝壳制成的圆形纽扣和由1龄池螺蚌外套膜制成的1 mm方形小片,插入池螺蚌外套膜内,植核手术完成后,将其放入同一水环境中养殖,并在植核手术进行的0、7d、15d、30d、60d、90d和120d进行外套膜/珍珠囊取样,qPCR检测*HsPif*的表达量的变化。

制备探针:设计*HsPif*基因的特异性引物F和R,其中R包含T7启动子序列,提取*HsPif*基因的重组质粒,以F(5'-TAATACGACTCACTATAGGGCAATGTCTCTCTGTCTCAAT-3')、R(5'-ATTCCAAGATTCAACTCCGT-3')为反应引物,以*HsPif*基因的重组质粒模板进行PCR反应。PCR反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳检测反应,将切胶回收纯化得到的产物作为体外转录的模板,转录反应根据T7 High Efficiency Transcription Kit和DIG RNA Labeling Kit(Roche)说明书进行,纯化按照Easy RNA Purification Kit试剂盒说明书进行。

取池螺蚌外套膜,在通用型组织固定液中固定1h,经常规脱水、浸蜡、包埋,切片厚度6—8 μm,切片脱蜡至水。杂交反应参考Enhanced Sensitive ISH Detection Kit II (AP)(BOSTER)说明书稍作改正进行,将杂交操作完成的切片置于荧光导致显微镜下观察,标记其杂交反应发生位置和放大标尺。

1.7 数据统计

数据处理采用2^{-ΔΔC_t}方法计算,以SPSS软件进行差异性分析,用GraphPad Prism进行作图。

2 结果

2.1 *HsPif*基因蛋白氨基酸组成分析

将测序得到的中间片段、5'端和3'端的序列进

行拼接, 得到*HsPif*基因的cDNA全长为3457 bp, 5'端非翻译区(5'UTR)为485 bp, 3'端非翻译区(3'UTR)为363 bp, ORF框3072 bp, 共编码1023个氨基酸, 推测编码HsPif97和HsPif80两种蛋白。预测分子量为110.484 kD, 理论等电点为4.67, 该蛋白为酸性蛋白。运用生物信息学预测其氨基酸组成成分, 结果表明天冬氨酸(Asp)含量最高, 占12.5%, 组氨酸(His)含量最低, 占1.32%。

2.2 HsPif蛋白的亲水性和疏水性分析

将得到的HsPif氨基酸序列于ExPASy网站进行亲疏水性的分析, 结果显示, 疏水氨基(Ala、Cys、Ile、Met、Leu、Phe、Val)占30.4%, 亲水性氨基酸(Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr)占69.6%, 总平均亲水性指数为-0.566, 故HsPif为亲水性氨基酸。

2.3 HsPif蛋白结构预测分析

使用NCBI网站中的SMART程序来对池螺蚌Pif氨基酸序列进行结构域分析, 在N端从32到207位氨基酸中存在1个VWA, N端从536到733位氨基酸中有三个ChtBD2(几丁质结合结合域), 三个ChtBD2长度从左到右依次为85、53和48个氨基酸。

2.4 HsPif蛋白的二级结构和三级结构分析

使用Prabi程序对Pif氨基酸的二级结构进行预测和分析, 发现HsPif中 α 螺旋(Alpha helix, Hh)含量占19.63%, β 折叠(Beta turn, Tt)占8.43%, 无规则卷曲(Random coil, Cc)占55.09%, 延伸链(Extended strand, Ee)占16.86%, 其中 β 折叠、延伸链和无规则卷曲均匀的分布在HsPif蛋白质中, 而 α 螺旋则主要分布在蛋白质的前中部。

使用SWISS MODLE网址对HsPif蛋白三级结构进行预测, 发现HsPif三级蛋白结构模型中的 α 螺旋的分布与二级结构中的分布情况一致, 主要分布在前中部, 说明其三级结构预测是相对正确的(图1)。

2.5 HsPif的同源比对和系统进化树

将得到的HsPif序列于NCBI网站上进行蛋白比对, 结果显示HsPif与三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)的同源性最高, 为97.97%, 其次是同源性为37.71%的厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*), 同大珠母贝(*Pinctada maxima*)、黑蝶贝(*Pinctada margaritifera*)和虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)的同源性分别为36.18%、35.92%和31.10%。HsPif蛋白序列与其他贝类的同源对比, 池螺蚌含有保守的VWA结构域和相对保守的ChtBD2(几丁质结合结合域)。

*HsPif*和其他含有*Pif*基因的其他贝类构建系统进化树, 结果显示贝类中的*Pif*主要分为两大支,

*HsPif*与三角帆蚌聚为一支, 其他贝类聚为另一支, 如图2说明*HsPif*在进化的过程中趋向保守。

2.6 组织荧光定量分析

通过qPCR检测池螺蚌各个组织*HsPif*基因的表达水平, *HsPif*基因在性腺的表达水平设为1, 外套膜套膜区表达量最高, 肝胰腺、外套膜中央膜区和外套膜边缘膜区较高, 而心脏、血细胞和肾脏表达水平较低(图3)。这说明*HsPif*基因主要表达场所为外套膜, 而外套膜是珍珠质分泌的主要场所, 推测*HsPif*基因与珍珠的形成有一定关系。

2.7 分子原位杂交

为了进一步确定*HsPif*基因的确切表达位置, 确定其在珍珠形成中的作用, 进行原位杂交反应, 结果显示, 主要在池螺蚌外套膜的缘膜部上皮细胞发生杂交反应, 表明*HsPif*基因与珍珠质的形成有关(图4)。

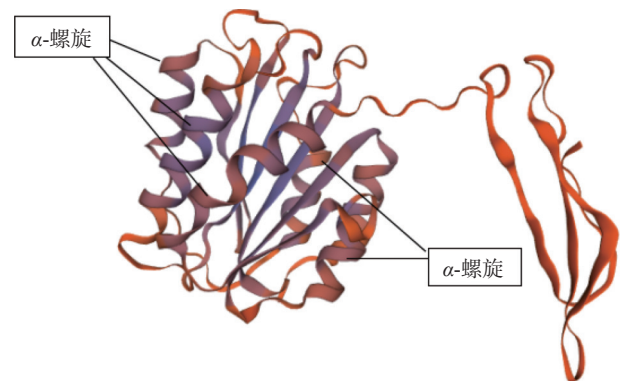


图1 *HsPif*蛋白的三维结构

Fig. 1 The three-dimensional structure of *HsPif* protein

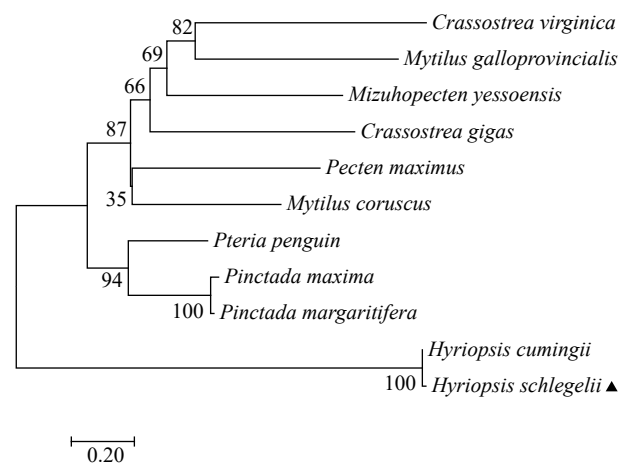


图2 池螺蚌及其他物种*Pif*的系统进化树

Fig. 2 The phylogenetic tree of *HsPif* from *Hyriopsis schlegelii* and other species

三角形位置为*HsPif*

The triangle position is *HsPif*

2.8 珍珠形成早期*HsPif*基因在珍珠囊中的表达分析

取池螺蚌植核手术后0、7d、15d、30d、60d、90d和120d七个时间点珍珠囊样品,采用qP-

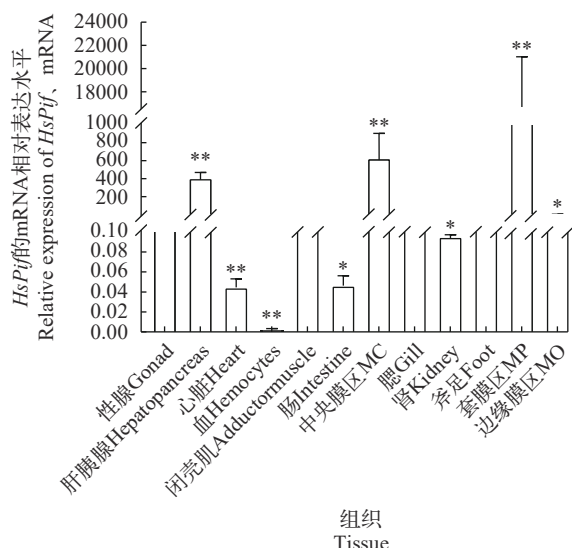


图3 *HsPif* mRNA在池螺蚌不同组织中的相对表达水平

Fig. 3 The relative expression level of *HsPif* mRNA in different tissues of *Hypriopsis schlegelii*

MC中央膜区(Central zone), MP套膜区(Pallial zone), MO边缘膜区(Marginal zone); *HsPif*在性腺的表达水平设为1, 不同组织之间比较显著性水平; $P < 0.01$ 标记为**, $P < 0.05$ 标记为*

MC central zone (central zone), MP mantle zone (pallial zone), MO marginal zone (marginal zone); the expression level of *HsPif* in the gonads is set to 1, and the level of significance among different tissues is relatively significant; $P < 0.01$ is marked as **, $P < 0.05$ is marked as *

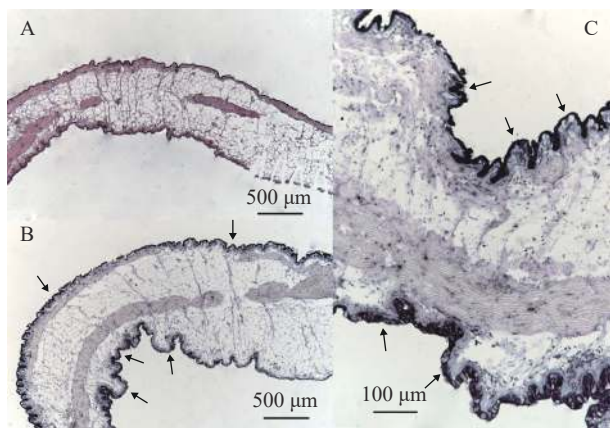


图4 *HsPif*基因在池螺蚌外套膜中原位杂交结果

Fig. 4 Results of *in situ* hybridization of *HsPif* gene in the mantle of *Hypriopsis schlegelii*

A为阴性对照, B为实验组, C为B局部放大, 箭头所指位置为原位杂交发生位置

A is the negative control, B is the experimental group, C is the local enlargement of B, and the position indicated by the arrow is the position where *in situ* hybridization occurs

CR技术对*HsPif*基因进行表达量分析, 结果表明, 植核后第7天显著降低, 随后升高, 在第60天达到最高, 第90天*Pif*的表达量显著降低, 随后表达量升高(图5)。

3 讨论

贝类*Pif*基因由Suzuki等^[7]在合浦珠母贝珍珠层中首次分离并报道, *Pif*是珍珠质中的一种酸性基质蛋白, 该基因经转录翻译后形成*Pif97*和*Pif80*, 参与文石的形成与堆积。本实验对池螺蚌*Pif*基因(*HsPif*)进行全长克隆和功能鉴定, 分析*HsPif*基因的全长序列发现: 该基因含有VWA和ChtBD2结构域, 在各种细胞外基质蛋白中, VWA结构域的功能通常与蛋白质之间的相互作用的调节有关^[16], 且*Pif*可与其他珍珠层形成相关的蛋白相互结合^[16], 推测该基因与珍珠层的形成有关。这与其他贝类中的*Pif*基因及其同系物都具有VWA和ChtBD2结构域相似^[7, 13], 说明了*Pif*基因的保守性较高。分析*HsPif*基因的同源比对性和构建进化树结果显示: *HsPif*与三角帆蚌*Pif*在同一支上, 说明池螺蚌与三角帆蚌有较近的亲缘关系, 且与其他贝类在同一大支上, 这也验证了*Pif*基因保守性较高。*HsPif*基因可能与其同系物具有相似的珍珠层生物矿化机制。

在贝类中, 生物矿化主要发生在外套膜, 钙离子和碳酸氢钙离子结合, 达到饱和状态后发生结晶、沉积^[17]。贝类的外套膜可分为边缘膜区(Marginal zone, MO)、套膜区(Pallial zone, MP)和中央膜区(Central zone, MC) 3个部分^[18, 19]。边缘膜区负责分泌形成棱柱层的大分子物质, 中央膜区和套膜

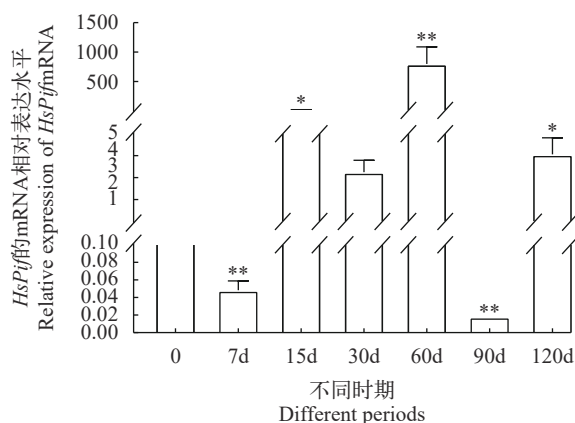


图5 池螺蚌进行植核手术后不同时期*HsPif*的表达量变化

Fig. 5 Changes in the expression of *HsPif* in different periods after nucleus grafting

第0天设为1, 不同时期之间比较显著性水平; $P < 0.01$ 标记为**, $P < 0.05$ 标记为*

Day 0 is set to 1, and the significance level is compared between different periods; $P < 0.01$ is marked as **, $P < 0.05$ is marked as *

区主要是负责分泌形成珍珠层的有机质^[19, 20]。本实验对3龄池蝶蚌的组织表达检测中可发现: *HsPif* 基因在各组织均有表达, 该基因在套膜区、中央膜和边缘膜区膜较高, 而心脏、血细胞和肾脏表达水平较低, 且*HsPif*基因在套膜区中显著高表达, 说明该基因与珍珠层的形成相关。在本实验中, 除了组织表达分析外, 为了了解*HsPif*基因在外套膜中的确切表达位置, 进行了分子原位杂交实验, 结果显示, 主要在外套膜缘膜上皮细胞检测到杂交信号, 进一步表明*HsPif*有可能参与珍珠层的形成过程。

珍珠是由软体动物分泌的生物矿物而形成的珠粒, 是由软体动物外套膜受外来刺激或自身病变形成的珍珠囊分泌形成。在珍珠产业中, 外套膜移植与宿主外套膜的结缔组织融合形成完整的珍珠囊, 珍珠囊细胞开始分泌基质蛋白来控制晶体生长, 最终形成珍珠^[21]。因此, 珍珠囊在珍珠层的生物矿化中类似于外套膜。本研究分析了珍珠形成过程中*HsPif*在珍珠囊中的表达, 结果显示*HsPif*在第7天表达量极低, 植核后的7d内, 植核手术伤口还未愈合, 处于外套膜小片与蚌体自身外套膜组织相互融合的过程, 未分泌珍珠质, 这与王烈华等^[22]的研究结果相似, 在珍珠囊扁平细胞出现时才开始(植核后7—15d)分泌珍珠质; 在15d后*HsPif*表达水平上升, 说明珍珠囊已初步形成, 开始有少量珍珠质; 30d时, *HsPif*的表达水平降至对照组水平, 表达量相对较低, 这可能是处于珍珠形成的不规则碳酸钙沉积阶段, 珍珠囊内基质蛋白表达低^[4]。*HsPif*在第30至第60天显著表达, 表明*HsPif*为CaCO₃提供了成核位点, 珍珠层已形成^[4, 23]。理论上, 形成珍珠层后*HsPif*应该是稳定表达的。而在植核第90天后出现显著降低, 这可能是受天气或者其他外部条件的刺激而导致蚌体发生其他免疫反应, 阻碍珍珠质的稳定分泌。总之, 本文首次从池蝶蚌中克隆出*Pif*基因的cDNA全长序列, 且池蝶蚌植核手术后珍珠囊中*Pif*基因的表达说明其与珍珠层的形成有关, 为进一步研究珍珠的形成提供参考。

参考文献:

- [1] Williams S T. Molluscan shell colour [J]. *Biological Reviews*, 2017, **92**(2): 1039-1058.
- [2] Suzuki M, Nagasawa H. Mollusk shell structures and their formation mechanism [J]. *Canadian Journal of Zoology*, 2013, **91**(6): 349-366.
- [3] Cuif J P, Dauphin Y, Howard L, *et al.* Is the pearl layer a reversed shell? A re-examination of the theory of pearl formation through physical characterizations of pearl and shell developmental stages in *Pinctada margaritifera* [J]. *Aquatic Living Resources*, 2011, **24**(4): 411-424.
- [4] Liu X, Li J, Xiang L, *et al.* The role of matrix proteins in the control of nacreous layer deposition during pearl formation [J]. *Proceedings Biological Sciences*, 2012, **279**(1730): 1000-1007.
- [5] Nudelman, F. Nacre biomineralisation: A review on the mechanisms of crystal nucleation [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2015(46): 2-10.
- [6] Watabe N. Studies on shell formation. XI. crystal-matrix relationships in the inner layers of mollusk shells [J]. *Journal of Ultrastructure Research*, 1965(12): 351-370.
- [7] Suzuki M, Saruwatari K, Kogure T, *et al.* An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation [J]. *Science*, 2009, **325**(5946): 1388-1390.
- [8] Sato Y, Inoue N, Ishikawa T, *et al.* Pearl microstructure and expression of shell matrix protein genes MSI31 and MSI60 in the pearl sac epithelium of *Pinctada fucata* by in situ hybridization [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(1): e52372.
- [9] Jiao Y, Wang H, Du X, *et al.* Dermatopontin, a shell matrix protein gene from pearl oyster *Pinctada martensii*, participates in nacre formation [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, **425**(3): 679-683.
- [10] Blay C, Planes S, Ky C L. Cultured pearl surface quality profiling by the shell matrix protein gene expression in the biomineralised pearl sac tissue of *Pinctada margaritifera* [J]. *Marine Biotechnology (New York, N Y)*, 2018, **20**(4): 490-501.
- [11] Joubert C, Piquemal D, Marie B, *et al.* Transcriptome and proteome analysis of *Pinctada margaritifera* calcifying mantle and shell: focus on biomineralization [J]. *BMC Genomics*, 2010, **11**(1): 613.
- [12] Suzuki M, Iwashima A, Kimura M, *et al.* The molecular evolution of the pif family proteins in various species of mollusks [J]. *Marine Biotechnology (New York, N Y)*, 2013, **15**(2): 145-158.
- [13] Bahn S Y, Jo B H, Hwang B H, *et al.* Role of Pif97 in nacre biomineralization: *in vitro* characterization of recombinant Pif97 as a framework protein for the association of organic-inorganic layers in nacre [J]. *Crystal Growth & Design*, 2015, **15**(8): 3666-3673.
- [14] Blay C, Parra D S, Cabral P, *et al.* Correlations between cultured pearl size parameters and PIF-177 biomarker expression in *Pinctada margaritifera* families reared in two contrasting environments [J]. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 2016(182): 254-260.
- [15] Wu D, Wang C, Zhang W, *et al.* Molecular characterization of an inhibitor of apoptosis protein (IAPs) in freshwater pearl mussel, *Hyriopsis schlegelii* [J]. *Bioengineered*, 2019, **10**(1): 365-373.
- [16] Hynes R O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines [J]. *Cell*, 2002, **110**(6): 673-687.
- [17] Giles R, Manne S, Mann S, *et al.* Inorganic overgrowth of

- aragonite on molluscan nacre examined by atomic force microscopy [J]. *The Biological Bulletin*, 1995, **188**(1): 8-15.
- [18] Du X D. Ultrastructure of epithelial cells of the mantle of *Pinctada maxima* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1999, **45**(3): 246-251. [杜晓东. 大珠母贝外套膜表皮细胞的超微结构 [J]. *动物学报*, 1999, **45**(3): 246-251.]
- [19] Funabara D, Ohmori F, Kinoshita S, *et al.* Novel genes participating in the formation of prismatic and nacreous layers in the pearl oyster as revealed by their tissue distribution and RNA interference knockdown [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(1): e84706.
- [20] Liu X L. Cloning and functional studies of new genes related to mineralization in different regions of mantle from *Pinctada martensii* [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2015, 9-13. [刘晓丽. 马氏珠母贝外套膜不同区域差异矿化基因的克隆及功能研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2015, 9-13.]
- [21] Arnaud-Haond S, Goyard E, Vonau V, *et al.* Pearl formation: persistence of the graft during the entire process of biomineralization [J]. *Marine Biotechnology (New York, NY)*, 2007, **9**(1): 113-116.
- [22] Wang L H. Causes and prevention of the formation of defective pearls [J]. *Fishery Guide to Be Rich*, 2006(14): 46. [王烈华. 次品珍珠形成的原因和预防 [J]. *渔业致富指南*, 2006(14): 46.]
- [23] Liu X J, Jin C, Wu L M, *et al.* Hic74, a novel alanine and glycine rich matrix protein related to nacreous layer formation in the mollusc *Hyriopsis cumingii* [J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2017, **2**(3): 119-123.

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF *HSPIF* FROM *HYRIOPSIS SCHLEGELII*

XIONG Ya-Ping^{1,2}, MA Hui-Mei^{1,2}, HU Bei-Juan^{1,2}, QIU Qi-Jun³ and HONG Yi-Jiang^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 2. Jiangxi Province Key Laboratory of Aquatic Animal Resources and Utilization, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 3. Fisheries Research Institute of Fuzhou City, Fuzhou 334000, China)

Abstract: At present, there are few researches on the pearl breeding mechanism of the high-quality freshwater mussel *Hyriopsis schlegelii*, and the *Pif* gene is closely related to the formation of shellfish pearls. In order to explore the preliminary function of *Pif* gene of *Hyriopsis schlegelii*, the full-length cDNA sequence of *Pif* gene was obtained for the first time in *Hyriopsis schlegelii* by RACE-PCR technique, which is named *HsPif*. The full-length untranslated region (5'UTR) of 5'-terminal untranslated region of *Pif* gene was 485 bp, 3' untranslated region (3'UTR) and 363 bp, open reading frame (ORF) 3072 bp, which encodes a total of 1023 amino acids. It was speculated that the bioinformatics analysis of two proteins encoding *HsPif97* and *HsPif80* showed that HsPif protein contained one von-Willebrand factor A (VWA) domain and three chitin binding domains (ChtBD2). The results of amino acid composition showed that the content of aspartic acid was the highest, accounting for 12.5%, and the content of histidine was the lowest, accounting for 1.32%. The α helix content in the protein secondary structure accounted for 19.63%, the irregular crimp accounted for 55.09%, and the extension chain accounted for 16.86%. The hydrophilic index of HsPif protein was -0.566. Phylogenetic tree analysis showed that *HsPif* and *Hyriopsis cumingii Pif* were the most conservative in one branch and on the same large branch as other shellfish. The results of tissue fluorescence quantitative PCR showed that *HsPif* gene was mainly expressed in the mantle, and *in situ* hybridization showed that the hybridization reaction mainly occurred in the mantle epithelial cells. The changes of *HsPif* gene expression were detected by qPCR after grafting. The results showed that *HsPif* gene expression changed with the development of pearl sac. The expression level of *HsPif* gene decreased significantly on the 7th and 90th day after nuclear insertion, and significantly increased on the 15th, 60th and 120th day. There was no significant change between the 30th day and the control group. The above experimental results suggest that *HsPif* gene may be related to the secretion and formation of pearls, which is helpful to further understand the mechanism of pearl formation and provide reference for pearl culture.

Key words: *HsPif*; Gene cloning; *In situ* hybridization; Grafting; Tissue expression; Pearl sac; *Hyriopsis schlegelii*