

杂色鲍后消化道生长相关基因 *HdEGF1* 的研究

张 洁, 陈志森, 陈 军*, 柯才焕, 游伟伟

(厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361102)

摘要: 附着变态是许多海洋无脊椎动物幼体生长发育的一个必经过程, 是幼体性状消失而成体性状展开的关键阶段。报道了与附着变态密切相关的杂色鲍 *HdEGF1* 基因的克隆、序列分析及其时空表达模式。运用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)克隆了 *HdEGF1* 基因全长 cDNA 序列。该基因全长 1 239 bp, 含 1 个 343 个氨基酸残基的开放阅读框(ORF), 推测的蛋白序列包含 3 个 Ca^{2+} 结合类表皮生长因子(EGF-CA)结构域和 1 个血管性血友病因子(vWFA)结构域。通过序列相似性比较, 确定其为新型表皮生长因子 1(EGF1)相关蛋白。荧光定量 PCR(qPCR)结果显示 *HdEGF1* 基因在幼体附着后的表达量比附着前任一时期均高 19 倍以上; 全胚原位杂交(WMISH)结果显示 *HdEGF1* 基因集中表达在变态后幼体后消化道的表皮细胞。*HdEGF1* 基因的这种时空表达模式表明 *HdEGF1* 受严格的时空调控, 直接参与了附着后杂色鲍幼体后消化道的生长和细胞分化。推测 *HdEGF1* 蛋白与某未知的 vWFA-结合蛋白一道调控着杂色鲍幼体后消化道的空间走向。因此, *HdEGF1* 蛋白很可能在后肠的形态建成中起着非常核心的作用。本研究为贝类肠道形态建成机制的深入研究提供了切入点, *HdEGF1* 基因可以作为重要的标志分子, 用于深入研究肠道形态建成过程中的信号通路、细胞分化和细胞迁移。

关键词: 杂色鲍; 附着变态; 表皮生长因子相关蛋白; *HdEGF1* 基因; 消化道末端

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2013)04-0560-09

多数海洋底栖无脊椎动物具有典型的浮游幼体阶段和底栖成体阶段的两相生活史, 连接这 2 个生活相位的附着和变态过程是重要的海洋生态学现象。附着和变态过程迅速而复杂, 对其间发生的生物学过程的基因调控机理研究将带来细胞生物学和发育生物学理论突破^[1-3]。鲍科(Haliotidae)动物的浮游幼体呈卵黄营养, 浮游阶段短暂(3~4 d), 培养方便, 可作为研究无脊椎动物幼体发育和附着变态的良好材料^[4-5]。鲍的胚胎发生包括螺旋卵裂、成中内胚层细胞(mesentoblast)的形成和担轮幼虫阶段。孵化后担轮幼虫很快发育成自由游泳的面盘幼虫, 2~4 d 后进入感受态^[6], 此时能感受环境中的附着因子而发生附着进而开始变态^[3-4]。附着 10~14 d 后变态完成, 彻底形成成体的躯体蓝图^[1]。

表皮生长因子(EGF)相关蛋白是一组具有相似结构和功能的糖蛋白^[7], 它们均至少包含 1 个保守的

由 3 对二硫键维持的 EGF 结构域。EGF 相关蛋白具有非常重要的细胞功能, 其一旦与细胞膜表面的 EGF 受体蛋白(EGFR)结合, 可立即诱发后者二聚化并激活胞内信号传导途径, 引发一系列的生化效应, 比如增加细胞间 Ca^{2+} 浓度、加快糖酵解和蛋白合成、促进细胞分裂和分化等^[8]。已有文献报道 EGF 相关蛋白在海洋底栖无脊椎动物的胚胎发育或变态过程中具有重要的功能, 比如 Hursh 等发现 EGF1 相关蛋白 Fibropelin-1 包裹在海胆胚胎的周围, 引导了海胆胚胎的形态^[9-11]; Eri 等从海鞘(*Herdmania curvata*)获得一个新的 EGF 相关基因称为 *Hemps*, 该基因包含 4 个 EGF 类似重复序列, 对海鞘的变态起了重要的调节作用^[12-13]。

在本实验室先前的杂色鲍幼体各阶段的转录组研究工作中, 发现杂色鲍 *EGF1* 基因(*HdEGF1*) 在附着变态时期的表达量急剧上升^[14]。因此这个基因很可能参与了杂色鲍幼体附着变态的特有生物学过程。本研究采用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)方法得到 *HdEGF1* 基因的全长 cDNA 序列, 进行了基因的序列和结构分析, 并利用 qPCR 和全胚原位杂交(WMISH)方法确定了其在杂色鲍幼体各个发育时期的时空表达模式, 由此框定了 *HdEGF1* 基因的功能。

收稿日期: 2013-01-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(40976093); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2012AA10A412)

* 通信作者: chenjun@xmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

本实验采用的亲鲍来自福建省漳浦县宏运鲍育苗基地。

Ex Taq DNA Polymerase、pMD19-T Vector 购自大连宝生物公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒、AxyPrep PCR 纯化试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司;Trizol 试剂、Qubit Fluorescent 购自 Invitrogen 公司;MicroPoly(A) Purist kit、MEGAscript® Kit 购自 Ambion 公司;SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit 购自 Clontech 公司;Digoxigenin-11-UTP 和 Anti-Digoxigenin-AP 购自 Roche 公司;SuperReal PreMix(SYBR Green)购自天根生化科技(北京)有限公司;引物的合成由上海生工生物公司完成;其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 杂色鲍幼体收集

依据文献的方法对杂色鲍进行培育^[15],育苗时水温 27 ℃,海水密度 1.023。取 40 只雌鲍和 10 只雄鲍作为亲鲍,雌雄分开,雌鲍排出的卵子用 300 目的筛绢网收集。当卵子收集好后,用吸管吸取新鲜排出的精子,与卵子受精后,早期胚胎在室温下培养,期间不断换水防止水质恶化。在显微镜下观察幼体的形态变化,并根据实验需要一共取 7 个时期的杂色鲍早期发育样品,分别是二细胞时期(0.5 hpf,其中 hpf 表示受精后的小时数,纵裂为 2 个细胞);桑椹胚时期(3.3 hpf,细胞分裂成桑椹状);担轮时期(9.1 hpf,有纤毛环带摆动);面盘幼体(19 hpf,顶部凹陷而成面盘);面盘幼体(58 hpf,幼体扭转、具有明显壳障);面盘幼体(74 hpf,出现眼点、身体可收缩至壳内);附着后 3 d 幼体(144 hpf,具头部触角、面盘退化、纤毛脱落、完全营匍匐生活、足部肌肉发达)。每个时期的样品分为 2 份,一份用于总 RNA 提取,经无菌海水清洗后加入 Trizol 试剂,保存在 -80 ℃ 冰箱备用;另一份用于全胚原位杂交,采取以下步骤的固定:面盘时期扭转之前的幼体用过滤的海水冲洗后,放入 4% (质量分数) 多聚甲醛(PFA)溶液固定过夜(至少 12 h 以上),然后梯度甲醇脱水并保存于 100% (体积分数) 甲醇溶液中,置于 -20 ℃ 备用。如文献[5]方法,面盘时期扭转之后的幼体先用 MgCl₂ 溶液(350 mmol/L)麻醉 10 min,然后按照以上方法固定、脱水和保存。

1.3 RNA 提取和 cDNA 合成

保存于 Trizol 试剂的 7 个不同发育时期的样品,通过总 RNA 提取、mRNA 分离和反转录等步骤,分别

合成全长 cDNA 文库。此部分的工作已经发表^[16],简述如下:以 Trizol 试剂分别提取 7 个时期样品的总 RNA、以 MicroPoly(A) Purist kit 纯化 mRNA、以 SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit 反转录为全长 cDNA 文库。此时每个文库中的每条 cDNA 的 5' 端加了 Template-switch 接头,3' 端加了 3' CDS 接头。以 Qubit Fluorescent 测定每个文库的 cDNA 浓度,然后从 7 个 cDNA 文库中取等量的 cDNA 混合,并调整浓度到 1 ng/μL,此混合 cDNA 样品命名为 MixA。所有的 cDNA 保存于 -80 ℃ 冰箱。

1.4 *HdEGF1* 基因全长 cDNA 的克隆

由于以上构建的 cDNA 文库中的每条 cDNA 都接上了 5' 端和 3' 端接头,RACE 采取以下方案执行:在 cDNA 的 5' 端共同的 Template-switch 接头设计引物 5'-CP,在 cDNA 的 3' 端共同的 CDS 接头设计引物 3'-CP(表 1);参考本实验室转录组测序^[14]获得的 *HdEGF1* 片段(GenBank 登录号:JU062709.1)分别设计 5' 特异性引物 5'-SP 和 3' 特异性引物 3'-SP(表 1);以 MixA 为模板扩增杂色鲍 *HdEGF1* 基因 5' 端和 3' 端的 cDNA:25 μL PCR 反应体系(1 μL MixA, 1 μL 5'-CP 或 3'-CP 引物(10 μmol/L), 1 μL 5'-SP 或 3'-SP 引物(10 μmol/L), 2.5 μL 10 × *Ex Taq* PCR 缓冲液, 2 μL 2.5 mmol/L dNTP, 0.25 μL *Ex Taq* 酶, 17.25 μL ddH₂O), 94 ℃ 热变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 32 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。所扩增的 PCR 产物用 1.2% (质量分数,下同) 的琼脂糖凝胶分析,切胶回收目的产物,连接于 pMD19-T 载体中,挑取阳性菌斑,送往上海英骏生物技术有限公司测序。测序结果拼接后得到杂色鲍 *HdEGF1* 基因的全长 cDNA 序列。

1.5 *HdEGF1* 基因在杂色鲍不同发育时期的 qPCR 表达分析

根据 *HdEGF1* 基因全长 cDNA 序列,设计一对 qPCR 正反引物 EGF-F 和 EGF-R(表 1)。对 *HdEGF1* 基因的 qPCR 引物进行下列质量控制:以 MixA 为模板进行 PCR, 1.2% (质量分数,下同) 琼脂糖凝胶电泳检测扩增条带是否锐利,大小是否符合设计;将 MixA 模板稀释为 5 个梯度(0.1, 0.01, 0.001, 0.000 1, 0.000 01 ng/μL),按照 Chen 等^[16]的方法进行荧光定量 PCR 反应,测定引物的 PCR 效率。本实验室已经确定了 *YB1/OAZ1/EIF5A* 在整个幼体发育时期稳定表达,2 个或多个基因的联合使用可以作为 qPCR 的可靠内参^[16]。因此,以 *YB1* 基因和 *OAZ1* 基因为内参,

表 1 实验所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

实验名称	引物	引物序列 (5'-3')	长度 (bp)	扩增效率
RACE	5'-CP	GTATCAACGCAGAGTACGCGG		
	5'-SP	GCCGCTGGTTGTATTGTG		
	3'-CP	ATCAACGCAGAGTACTTTTTTTTTTTT		
	3'-SP	GTGTCCAGCAGGATTCACG		
qPCR	EGF-F	CACAATACAACCAGCGGCTAC	164	1.97
	EGF-R	AATCCTGCTGGACACAAACAC	141	2.01
	OAZ1-F	GAACTCCTTGGCACATCAGAC		
	OAZ1-R	TCAGGAAGAATGCCAGAAGGT		
	YB1-F	AAGTTCTAGCAACGAGGGTCA	141	2.02
	YB1-R	GGTATTTCTTTGGGTTGTTCTTC	160	
WMISH	Probe-F	CCAGCAGGATTCACG		
	Probe-R	TAATACGACTCACTATAGGACACGGTTTCGAGA		
	PSY-F	CCCCGAACTGTTGGAGCA		288
	PSY-R	TAATACGACTCACTATAGGAGTGGAAC TTGGAGATGGTG		

注:横线部分为 T7 启动子序列.

以 7 个不同发育时期的杂色鲍幼体 cDNA 样品和 MixA(均稀释为 0.01 ng/ μ L)为模板,在 Rotor-Gene 3000 机器上进行正式 qPCR 反应:1 μ L 正向引物(5 μ mol/L),1 μ L 反向引物(5 μ mol/L),1 μ L 模板,12.5 μ L 2 $\times$ TransStart Green qPCR SuperMix (Trans-Gen,China),加 ddH₂O 到 25 μ L;95 $^{\circ}$ C 3 min,(95 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 15 s) $\times$ 45 个循环,每个反应设 3 个平行样,每轮实验设 1 个不加模板的阴性对照.由 Rotor-Gene 6.0.14 程序收集 C_t 数据.每个基因在 7 个发育时期的 C_t 数据以 2^{- Δ C_t} 方法^[17] (Δ C_t = C_{t stage} - C_{t MixA}) 转化为可比的表达量数据.在每个时期, *HdEGF1* 基因的表达量除以同时期 2 个内参基因表达量的几何平均,获得标定后的表达量.最终的表达量表示方式为:设最低表达量为 1,其他时期的表达量是最低值的倍数.误差由误差传递律推导.采用 SPSS 软件对不同样本的表达量进行配对 *t* 检验,差异性显著分析结果以 *p* 值表示. *p* < 0.05 为差异显著, *p* < 0.01 为差异极其显著(以 * * 表示).

1.6 HdEGF1 基因探针制备和 WMISH

在编码区内设计探针引物(表 1),以 MixA 为模板进行 PCR 扩增.1.2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物并用 PCR 清洁试剂盒纯化.PCR 产物克隆进

pMD19-T 载体中,挑取阳性菌斑,送往上海英骏生物技术有限公司测序.确定探针模板的准确之后,以纯化的 PCR 产物为模板,参照 MEGAscript® Kit 实验流程进行 RNA 探针的体外转录(DNA 1 μ g;5 $\times$ Transcription buffer 4 μ L;10 $\times$ DIG-labeling UTP RNA mix 2 μ L;RNase inhibitor 1 μ L;T₇ RNA polymerase 2 μ L;焦碳酸二乙酯(DEPC)处理过的水补到 20 μ L).以 37 $^{\circ}$ C 反应 3 h 后,加入 2U DNase I 除去 DNA 模板,得到的 RNA 探针于 -80 $^{\circ}$ C 保存.以植物特异的基因做为阴性对照,按上述流程合成了亚心形扁藻 (*Platymonas subcordiformis*) 的八氢番茄红素合成酶 (phytoene synthase,PSY) 基因片段的 RNA 探针,引物见表 1.

杂色鲍胚胎原位杂交实验参照 Williams 等^[5,18] 方法.胚胎幼体经系列 V(甲醇):V(3-码啉丙磺酸, MOPS)=7:3,5:5,2.5:7.5,0:10 复水,10 μ g/mL 蛋白酶 K 消化 20~30 min,0.2%(体积分数)甘氨酸/MOPS 终止反应,4%(体积分数)PFA 再固定 1 h,3%(体积分数)过氧化氢室温处理 30 min,5 $\times$ SSC 缓冲液洗涤.室温预杂交(50%(体积分数)去离子甲酰胺,5 $\times$ SSC、0.1% Tween 20、柠檬酸调节 pH 至 6.0、DEPC 水定容)20 min.换上杂交液(50%(体积分数)去离子甲酰胺,5 $\times$ SSC、0.1%(体积分数) Tween-20、

肝素 50 $\mu\text{g/mL}$ 、柠檬酸调节 pH 至 6、DEPC 水定容), 探针质量浓度 1~5 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 50 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜 (16 h). 多余的探针于 60 $^{\circ}\text{C}$ 经 $2\times\text{SSC}$, $0.2\times\text{SSC}$ 洗涤, 再于室温下经系列 $V(2\times\text{SSC}):V(\text{MOPS})=7.5:2.5, 5:5, 6.5:2.5, 0:0$ 洗涤, 用封闭液 (70% (体积分数) 马来酸缓冲液, 10% (体积分数) 山羊血清, 20% (体积分数) BM blocking reagent) 封闭探针 2.5 h; 在用马来酸缓冲液稀释 3 000 倍的抗地高辛抗体中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 与反义 RNA 探针结合过夜; 未结合的抗体用 $1\times\text{PBST}$ 溶液洗去, 再加入氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 和 5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐 (BCIP) 混合液显色 5~7 h, 迅速用终止液洗去多余的显色液, 显微镜观察拍照.

2 实验结果

2.1 杂色鲍 *HdEGF1* 基因的克隆和序列分析

参照 RACE 原理, 获得了杂色鲍 *HdEGF1* 的全长 cDNA (GenBank 登录号为 KC206064). 其由 1 239 bp 组成, 编码区为 1 032 bp, 编码 343 个氨基酸, 分子质量约为 37.4 ku, 理论 pI 是 7.32. 在第一个起始密码子 ATG 的上游有 20 bp 的 5' 非编码区, 在终止密码子下游有 183 bp 的 3' 非编码区, 包含 AATAAA 加尾信号和部分 poly(A) 序列. 用 SignalP 工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽, 用 TMHMM 工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测跨膜区, 结果显示推测的氨基酸序列含有信号肽但无其他跨膜结构, 说明该蛋白为细胞外基质蛋白, 信号肽剪切位点位于蛋白的第 15 与 16 氨基酸之间. 通过搜索 NCBI 的保守结构域数据库 (CDD) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 和 Expasy 的 PROSITE 数据库 (<http://www.expasy.org/prosite/>) 发现其含有 3 个 EGF-CA 结构域和 1 个 vWFA 结构域 (图 1). EGF-CA (CDD: cd00054) 为 Ca^{2+} 结合类表皮生长因子结构域, 具有保守的基序: $\text{CX}_{4-14}\text{CX}_{3-8}\text{CX}_{8-14}\text{CXCX}_{8-14}\text{C}^{[19]}$, 其中 6 个保守的半胱氨酸残基形成 3 对链内二硫键, 维持了结构域特定的棒状空间结构. 每个 EGF-CA 结构域都有一个 Ca^{2+} 结合位点, Ca^{2+} 的结合有利于调整组件间的合适方向并且保持组件的棒状配体结构, 这样的结构便于与受体结合以及功能发挥^[20]. 图 1 标注了半胱氨酸残基位点和 Ca^{2+} 结合位点. vWFA 结构域 (CDD 编号: cd01450) 即 Von Willebrand factor type A 结构域, 由约 200 个氨基酸残基折叠成桶装的 α/β 对-罗斯曼 (para-Rossmann) 模式. vWFA 结构域是重要的结构, 拥有金属离子和多个配体结合位点, 可以与

多种蛋白相互作用而激发下游一系列生物学过程. 其与配体的结合通常由其包含的金属离子依赖的粘附位点 (MIDAS 基序) 所介导. 图 1 标注了 MIDAS 基序. 在 *HdEGF1* 第一个 EGF-CA 结构域上游, 发现有连续 6 个 TTLPXVK 重复序列, 前 4 个重复序列的 X 为 R, 后 2 个重复序列的 X 为 S, 其功能未明.

BLAST 方法搜索 Swissprot 和 NCBI NR 非冗余蛋白序列数据库, 发现 *HdEGF1* 序列在 EGF-CA 结构域区域有大量相似条目, 但在全长序列范围, 除了牡蛎全基因组^[21] 拥有的 Fibropellin-1 (GenBank: EKC39446) 和 Fibropellin-3 (GenBank: EKC26638) 外, 没有其他相似蛋白, 因此 *HdEGF1* 是一种新型的 EGF1 相关蛋白. 图 2 展示了与 *HdEGF1* 的 EGF-CA 结构域最相似、并进行深入功能研究的 3 种 EGF1 蛋白的结构域排列模式. 它们都拥有多个 EGF-CA 结构域, 但各自又拥有其他特异的结构域. *HdEGF1* 的 EGF-CA 与这 3 个蛋白质的 EGF-CA 结构域相似性较高, 达 41% 以上, 这些 EGF-CA 结构域之间可能存在进化联系.

2.2 *HdEGF1* 基因在杂色鲍早期发育各时期的表达

HdEGF1 基因定量引物扩增片段大小为 164 bp. 通过使用梯度浓度的模板进行荧光定量测定, 计算获得 *HdEGF1* 基因定量引物扩增效率为 1.97, R^2 值为 0.997 8. 我们以 *YB1/OAZ1* 为内参, 获得了 *HdEGF1* 基因在 7 个发育阶段的相对表达量 (图 3). *HdEGF1* 基因在二细胞时期的表达量最低, 因此被设为 1. 可以明显地看出杂色鲍 *HdEGF1* 在附着前表达量相对较低, 在 1~20 之间波动, 但附着后, 表达量急剧上升到 385 左右, 比附着前的最高值 19.7 (感受态担轮幼虫晚期) 提高了 19 倍, 表达量变化极为显著 ($p<0.01$). 由此可见 *HdEGF1* 基因与附着变态特异的生物学过程显著相关, 可能是重要的附着变态相关基因.

2.3 *HdEGF1* mRNA 的原位杂交

用于探针合成的 DNA 模板经过测序, 序列与基因序列片段一致. 幼体发育各时期的原位杂交信号的强度变化在时序上与 qPCR 结果完全吻合: 其在附着前各个时期的 WMISH 信号非常微弱 (图 4 A~F), 无法与背景区分; 附着后则在背部的下半部分有明显而集中的信号 (图 4 G~I). WMISH 信号所在细胞具有规则的形状和紧密的排列, 因此这些细胞很可能是表皮细胞. 在空间上, *HdEGF1* 基因的表达位置以 U 形分布在背部后端表面. 仔细辨别信号, 可见在背侧线左侧有一条状信号往下延伸, 并逐渐突起, 在靠近外套膜

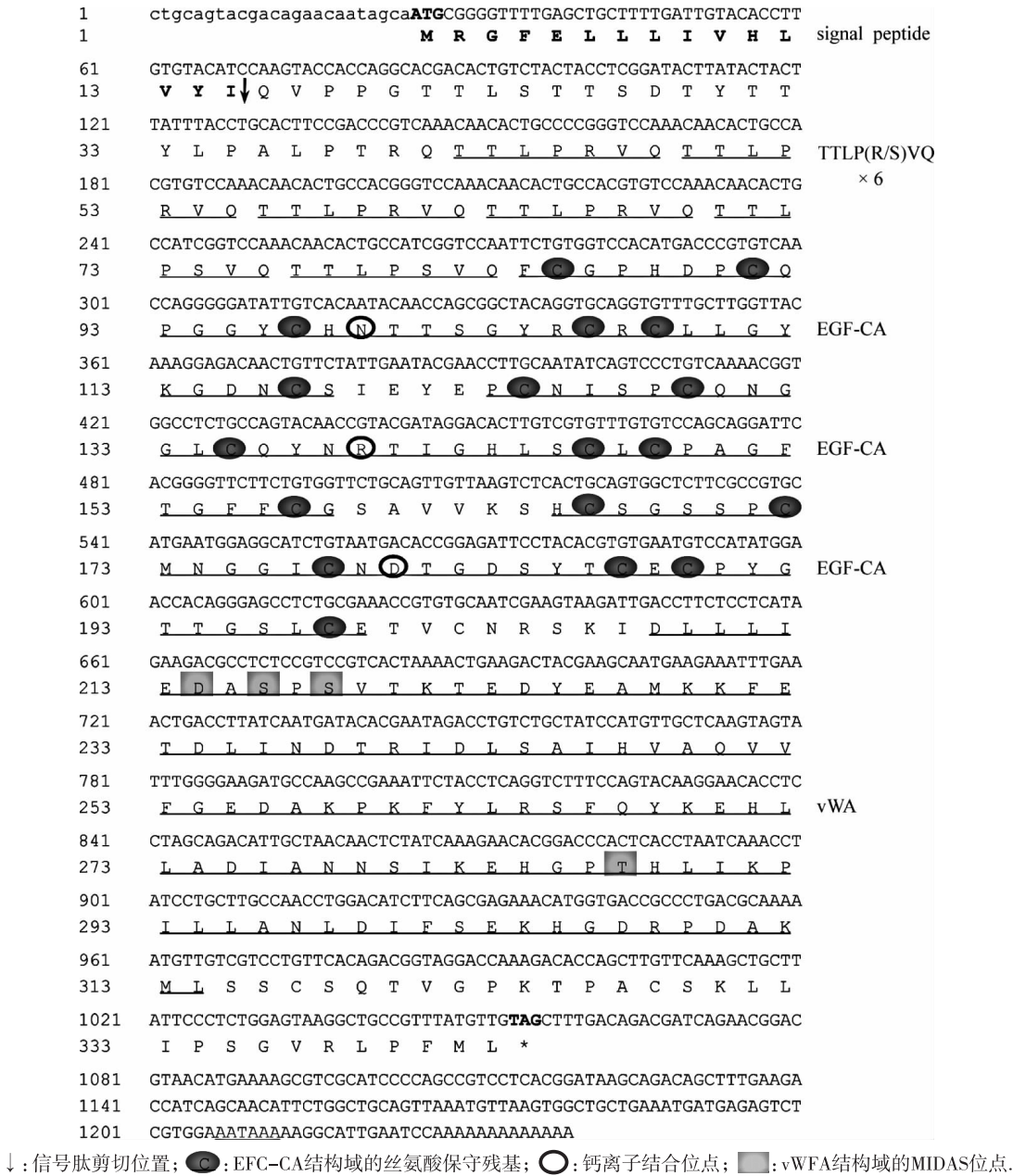


图 1 *HdEGF1* 基因的核苷酸和蛋白序列分析

Fig. 1 The full-length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *HdEGF1*

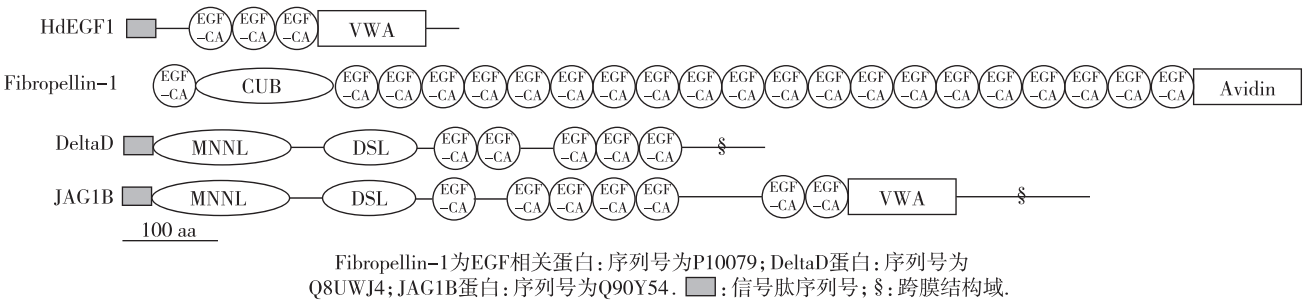
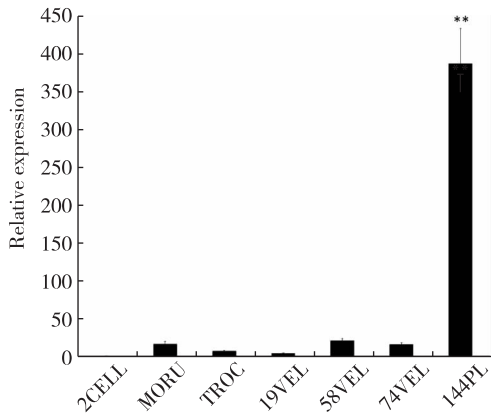


图 2 *HdEGF1* 蛋白和其他 3 种 EGF 相关蛋白序列的结构域图

Fig. 2 Domain structure of the putative protein *HdEGF1* and three similar proteins



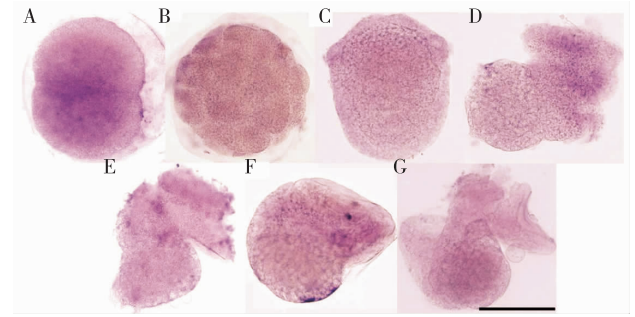
2CELL. 二细胞时期 (0.5 hpf); MORU. 桑椹胚时期 (3.3 hpf); TROC. 担轮时期 (9.1 hpf); 19VEL. 面盘幼体 (19 hpf); 58VEL. 面盘幼体 (58 hpf); 74VEL. 面盘幼体 (74 hpf); 144PL. 附着后 3 d 变态完成幼体 (144 hpf).

图 3 *HdEGF1* mRNA 在杂色鲍早期发育不同时期的表达情况

Fig. 3 Relative expression of *HdEGF1* mRNA in early developmental stages of *H. diversicolor*

与内脏团连接处迅速折回向上并偏向背侧线右侧(图 4G). 从右侧观察, 由于压片角度的原因, 有些压片只能观察到背侧线右侧的条状信号(图 4H); 而有些压片则把 U 形压成一束, 无法分辨其左右走向(图 4I). 回折的信号与内脏团的联系比较松散, 经常可看到其明显地被压片压出背部(图 4G, I). 根据这些位置特征, 我们判断这个 U 形组织是后消化道. 综合各个压片角度的 WMISH 结果, 绘制了从背部观察(图 4J)和

从右侧观察的幼鲍后消化道示意图(图 4K): 下行肠在背侧线左侧往下延伸, 距离外套膜与内脏团连接处约 30 μm 时迅速回折向上形成直肠, 直肠向右越过背侧线向上偏右方向延伸, 肛门出口于套膜腔. 这样的直肠和肛门位置与欧洲鲍幼体形态是相符的^[1]; 而下行肠与直肠之间的迅速回折则与杂色鲍成体后消化道走向是相符的^[22]. 作为阴性对照的亚心形扁藻 *PSY* 基因则无信号显示(图 5).



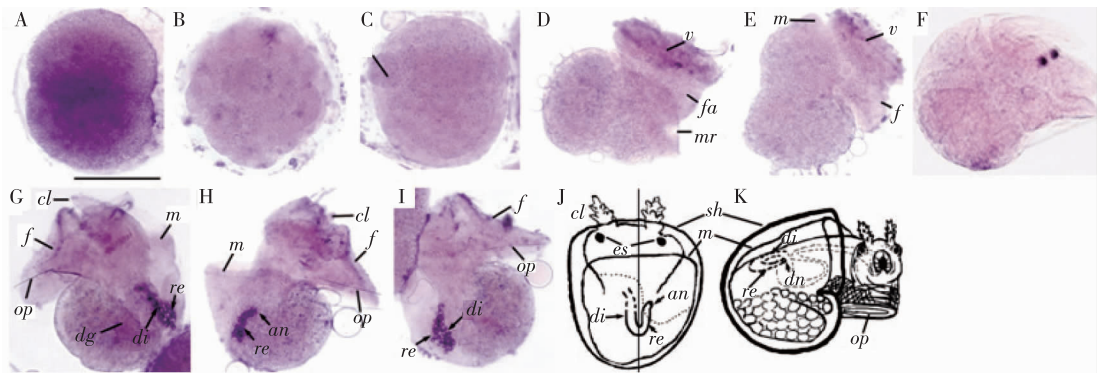
A. 二细胞时期 (0.5 hpf); B. 桑椹胚时期 (3.3 hpf); C. 担轮时期 (9.1 hpf); D. 面盘幼体 (19 hpf); E. 面盘幼体 (58 hpf); F. 面盘幼体 (74 hpf); G. 附着后 3 d 变态完成幼体 (144 hpf); 比例尺: 100 μm .

图 5 亚心形扁藻的 *PSY* 基因阴性对照

Fig. 5 Negative control of *PSY* in *P. subcordiformis*

3 讨 论

鲍科动物在浮游-底栖生活史转换过程中, 除了明



A. 二细胞时期 (0.5 hpf); B. 桑椹胚时期 (3.3 hpf); C. 担轮时期 (9.1 hpf); D. 面盘幼体 (19 hpf); E. 面盘幼体 (58 hpf); F. 面盘幼体 (74 hpf); G~K. 附着后变态幼体 (144 hpf); G. 左侧面幼体图; H, I. 右侧面幼体图; J, K. *HdEGF1* 基因表达在消化道末端的表皮细胞示意图; J. 俯视图; K. 右侧面示意图; 箭头指示信号位点; 虚线指示套膜腔的界限; 缩写表示意义: an. 肛门; ct. 头部触角; dg. 消化腺; di. 下行肠道; es. 眼点; f. 足; fa. 足原基; m. 外套膜; mr. 初始外套膜; op. 壳唇; p. 前毛轮; re. 直肠; sh. 壳; v. 面盘; 比例尺: 100 μm .

图 4 *HdEGF1* 基因不同时期胚胎和幼体的空间表达

Fig. 4 Spatial expression of *HdEGF1* in *H. diversicolor* embryos and larvae

显的形态变化比如面盘迅速消失、贝壳沉积模式改变之外,也发生了大量不容易分辨的生理和形态变化,比如消化系统的完善、成体肌肉组织的发生和幼体肌肉组织的萎缩、丘脑的转变、外套膜的增生^[1,23-24].这些发育过程在分子层次上则表现出附着前后相关基因的差异表达.杂色鲍 *HdEGF1* 基因正体现了这种附着前后差异表达特征,表明其参与了附着变态特有的生物学过程.对其序列和空间表达模式的深入分析,表明其是具有新型结构的与消化道末端发育有关的 *EGF1* 相关基因. *HdEGF1* 含有 3 个 EGF-CA 结构域和 1 个 vWFA 结构域,NCBI 搜索比对发现除了牡蛎全基因组^[21] 拥有的 Fibropellin-1 (GenBank: EKC39446) 和 Fibropellin-3 (GenBank: EKC26638) 外,没有其他蛋白同时拥有 EGF-CA 结构域和 vWFA 结构域,可见 *HdEGF1* 基因很可能是贝类特有的生长因子基因.有文献报道了 3 种贝类 EGF 相关蛋白,分别是光滑双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*) 的 EGF 相关基因^[25]、近江牡蛎 (*Crassostrea ariakensis*) 的 EGF 相关基因 *CaTLL*^[26] 和静水椎实螺 (*Lymnaea stagnalis*) 的 EGF 同源蛋白 L-EGF^[27],但它们与 *HdEGF1* 氨基酸序列没有可信的相似性.海鞘 (*Herdmania curvata*) 的 EGF 相关蛋白 Hemsps 被认为直接控制海鞘幼体的附着变态过程^[12],然而它与 *HdEGF1* 之间也没有可信的相似性.可见 *HdEGF1* 与这 3 种贝类 EGF 相关蛋白和海鞘 Hemsps 蛋白在结构和功能上有很大差别.

EGF1 相关基因与胚胎形态发生和组织发育有着密切联系.如图 2 所示的 *Fibropellin-1* 基因是最早发现的海洋无脊椎动物 EGF1 相关基因,其由海胆胚胎外胚层细胞分泌,以特定模式包裹在胚胎周围,引导了海胆胚胎的形态发生^[10]. *Fibropellin-1* 蛋白 C 端的亲和素 (Avidin) 结构域能形成多聚体,并能与其他蛋白比如生物素形成紧密的蛋白之间相互作用^[28],使得 *Fibropellin-1* 在胚胎发育过程中的作用具有明确的空间约束^[29].图 2 所示的 DeltaD 和 Jagged-1b 蛋白是来自斑马鱼的 Delta 同源蛋白,参与胚胎发育中的多个重要过程,比如早期神经发生和体节发生^[30]. DeltaD 和 Jagged-1b 蛋白的 N 端的 MNNL 结构域是与 Notch 受体家族成员结合的功能部位.确定了分化命运的细胞表达 Delta 家族成员后,Delta 作为配体与 Notch 结合引发 Delta-Notch 信号通路,介导旁侧抑制效应 (lateral inhibition),抑制相邻细胞走向与自身相同的细胞命运^[31].由此可见 EGF1 相关蛋白在胚胎形态发生中受到明确的空间约束,这种约束与其包含的具有蛋白-蛋白相互作用的结构域有关.位于 *HdEGF1*

蛋白 C 端的 vWFA 结构域是重要的结构和功能单位,其拥有多个配体结合位点,比如胶原蛋白结合位点、整合素抑制剂结合袋和糖蛋白 Ib (GpIb) 结合位点,能够通过蛋白-蛋白相互作用起着结构上的聚合作用. vWFA 结构域自发现以来就备受关注,其参与多种细胞功能,包括细胞外间质的基底膜形成、细胞迁移、细胞分化、附着、止血、信号传递、染色体稳定性、恶性转化和免疫防护等^[32].由此可以推测在杂色鲍幼体变态期间, *HdEGF1* 蛋白通过 vWFA 结构域与其他蛋白发生相互作用,协同引导消化道末端生长的空间走向.

卵黄营养型幼体必须在卵黄消耗完之前形成有功能的摄食和消化系统.事实上在附着变态前,鲍科动物幼体的摄食和消化器官的形态和功能已经基本具备^[33];而肠的形成和发育则开始于变态时期^[1,34].由于 40 hpf 的面盘幼虫已经可以通过滤食方式吸收肋球藻 (*Pleurococcus*) 或其他微型藻类^[1],所以肠道的生成是一个很快速的过程,而且肠道必须在附着后不久就具备消化功能.18 年前, Degan 等发现通过诱导变态可以显著地刺激胰乳蛋白酶的表达,而且表达胰乳蛋白酶的阿米巴样细胞也同时向后消化道迁移^[34]. Degan 等认为后消化道细胞类型的分化起始在变态之前,但细胞分化和定位的完成需要变态信号的刺激. *HdEGF1* 基因的时空表达模式与后消化道的形态建成在时空上是一致的,与胰乳蛋白酶的表达和阿米巴样细胞的迁移在时空上也是一致的.因此我们推测 *HdEGF1* 基因在后消化道的形态建成过程中起了非常核心的作用:一旦变态开始, *HdEGF1* 基因接受变态信号而迅速表达, *HdEGF1* 蛋白与 vWFA-结合蛋白相互作用形成复合体,继而引导后消化道原始表皮细胞的分化、增殖和走向,然后表皮细胞发出信号募集分泌消化酶的阿米巴样细胞.通过这样的细胞学过程,有功能的消化道系统得以快速有效地构建.因此,我们的研究结果为贝类肠道形态建成机制的深入研究提供了切入点,胰乳蛋白酶基因和 *HdEGF1* 基因可以作为重要的标志分子,用于深入研究肠道形态建成过程中的信号通路、细胞分化和细胞迁移.

参考文献:

- [1] Crofts D R. The development of *Haliotis tuberculata*, with special reference to organogenesis during torsion[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 1937, 228: 219-285.
- [2] Amano S, Hori I. Metamorphosis of coeloblastula performed by multipotential larval flagellated cells in the cal-

- careous sponge *Leucosolenia laxa* [J]. Biol Bull, 2001, 200:20-32.
- [3] Jackson D, Leys S P, Hinman V F, et al. Ecological regulation of development; induction of marine invertebrate metamorphosis[J]. Int J Dev Biol, 2002, 46:679-686.
- [4] Morse D E, Hooker N, Duncan H, et al. γ -aminobutyric acid, a neurotransmitter, induces planktonic abalone larvae to settle and begin metamorphosis [J]. Science, 204: 407-410.
- [5] Williams E A, Degnan S M. Carry-over effect of larval settlement cue on postlarval gene expression in the marine gastropod *Haliotis asinina* [J]. Mol Ecol, 2009, 18: 4434-4449.
- [6] Sawatpeera S, Upatham E S, Kruatrachue M, et al. Larval development in *Haliotis asinina* linnaeus [J]. J Shellfish Res, 2001, 20:593-601.
- [7] Dreux A C, Lamb D J, Modjtahedi H, et al. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands; their putative role in atherogenesis [J]. Atherosclerosis, 2006, 186:38-53.
- [8] Heldin C H. Dimerization of cell-surface receptors in signal-transduction [J]. Cell, 1995, 80:213-223.
- [9] Hursh D A, Andrews M E, Raff R A. A sea urchin gene encodes a polypeptide homologous to epidermal growth factor [J]. Science, 1987, 237:1487-1490.
- [10] Bisgrove B W, Andrews M E, Raff R A. Fibropellins, products of an EGF repeat-containing gene, form a unique extracellular matrix structure that surrounds the sea urchin embryo [J]. Dev Biol, 1991, 146:89-99.
- [11] Bisgrove B W, Raff R A. The SpEGF III gene encodes a member of the fibropellins; EGF repeat-containing proteins that form the apical lamina of the sea urchin embryo [J]. Dev Biol, 1993, 157:526-538.
- [12] Eri R, Arnold J M, Hinman V F, et al. Hemsps, a novel EGF-like protein, plays a central role in ascidian metamorphosis [J]. Development, 1999, 126:5809-5818.
- [13] Woods R G, Roper K E, Gauthier M, et al. Gene expression during early ascidian metamorphosis requires signalling by Hemsps, an EGF-like protein [J]. Development, 2004, 131:2921-2933.
- [14] Huang Z X, Chen Z S, Ke C H, et al. Pyrosequencing of *Haliotis diversicolor* transcriptomes; insights into early developmental molluscan gene expression [J]. PLoS ONE, 2012, 7:e51279.
- [15] You W W, Ke C H, Luo X, et al. Divergent selection for shell length in two stocks of small abalone *Haliotis diversicolor* [J]. Aquac Res, 2010, 41:921-929.
- [16] Chen J, Chen Z S, Huang Z X, et al. Stable expression of Y-box protein 1 gene in early development of the abalone *haliotis diversicolor* [J]. Int J Dev Biol, 2012, 56: 369-375.
- [17] Vandesompele J, de Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. Genome Biol, 2002, 3:research0034-1-research0034-11.
- [18] Giusti A F, Hinman V F, Degnan S M, et al. Expression of a *Scr/Hox5* gene in the larval central nervous system of the gastropod *Haliotis*, a non-segmented spiralian lophotrochozoan [J]. Evol Dev, 2000, 2:294-302.
- [19] Wharton K A, Johansen K M, Xu T, et al. Nucleotide-sequence from the neurogenic locus notch implies a gene-product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats [J]. Cell, 1985, 43:567-581.
- [20] Stenflo J, Stenberg Y, Muranyi A. Calcium-binding EGF-like modules in coagulation proteinases; function of the calcium ion in module interactions [J]. Bba-Protein Struct M, 2000, 1477:51-63.
- [21] Zhang G, Fang X, Guo X, et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation [J]. Nature, 2012, 490:49-54.
- [22] Di G, Ni J, Zhang Z, et al. Types and distribution of mucous cells of the abalone *Haliotis diversicolor* [J]. Afr J Biotechnol, 2012, 11:9127-9140.
- [23] Barlow L A, Truman J W. Patterns of serotonin and SCP immunoreactivity during metamorphosis of the nervous system of the red abalone, *Haliotis rufescens* [J]. J Neurobiol, 1992, 23:829-844.
- [24] Degnan B M, Morse D E. Developmental and morphogenetic gene regulation in *Haliotis rufescens* larvae at metamorphosis [J]. Amer Zool, 1995, 35:391-398.
- [25] Lockyer A E, Spinks J N, Walker A J, et al. *Biomphalaria glabrata* transcriptome; identification of cell-signalling, transcriptional control and immune-related genes from open reading frame expressed sequence tags (ores-tes) [J]. Dev Comp Immunol, 2007, 31:763-782.
- [26] Yang S, Wu X. Tollid-like gene in *Crassostrea ariakensis*; molecular cloning, structural characterization and expression by RLO stimulation [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27:130-135.
- [27] Hermann P M, van Kesteren R E, Wildering W C, et al. Neurotrophic actions of a novel molluscan epidermal growth factor [J]. J Neurosci, 2000, 20:6355-6364.
- [28] Laitinen O H, Hytonen V P, Ahlroth M K, et al. Chicken avidin-related proteins show altered biotin-binding and physico-chemical properties as compared with avidin [J]. Biochem J, 2002, 363:609-617.

- [29] Hunt L T, Barker W C. Avidin-like domain in an epidermal growth factor homolog from a sea urchin[J]. *Faseb J*, 1989, 3: 1760-1764.
- [30] Dornseifer P, Takke C, Campos-Ortega J A. Overexpression of a zebrafish homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *Delta* perturbs differentiation of primary neurons and somite development[J]. *Mech Dev*, 1997, 63: 159-171.
- [31] Campos-Ortega J A. Mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster* [J]. *Developmental Neurobiology*, 1993, 24(10): 1305-1327.
- [32] Sadler J E. Biochemistry and genetics of von willebrand factor[J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 395-424.
- [33] Spaulding D C, Morse D E. Purification and characterization of sulfatases from *Haliotis rufescens*: evidence for changes in synthesis and heterogeneity during development[J]. *J Comp Physiol*, 1991, 161: 498-515.
- [34] Degnan B M, Groppe J C, Morse D E. Chymotrypsin mRNA expression in digestive gland amoebocytes: cell specification occurs prior to metamorphosis and gut morphogenesis on the gastropod *Haliotis rufescens* [J]. *Roux Arch Devel Biol*, 1995, 205: 97-101.

A Study of *HdEGF1*, an EGF-related Gene in the Lower Digestive Tract from Small Abalone *Haliotis diversicolor*

ZHANG Jie, CHEN Zhi-sen, CHEN Jun*, KE Cai-huan, YOU Wei-wei

(College of Ocean & Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: Settlement and metamorphosis are indispensable processes in the development of most marine invertebrate larvae, which are critical stages directly related to the larvae developing to adult. The present study identified the full-length cDNA sequence of a *HdEGF1* gene from *Haliotis diversicolor*. The 1 239 bp full-length cDNA sequence was obtained through the technology of Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE). This cDNA encodes a novel epidermal growth factor (EGF) related protein with 343 amino acid residues that contains three calcium-binding EGF-like domains (EGF-CA) and a von willebrand factor type A domain (vWFA). Using quantitative PCR (qPCR) approach, the expression of the *HdEGF1* gene was found to be 19-fold higher at metamorphosis stage than at any pre-settlement stages. In addition, the result of whole mount in situ hybridization (WMISH) indicated that the mRNAs of the *HdEGF1* gene were found to be accumulated in the epidermal cells of the primitive hindgut of postlarvae. The vWFA domain analyses showed that the *HdEGF1* protein might control the spatial distribution of the lower digestive tract via interaction with vWFA-binding proteins. The differences of *HdEGF1* gene expression patterns before and after the settlement indicate that the development of the digestive tract downstream tissues is subjected to the strict regulation of settlement and metamorphosis. In conclusion, the *HdEGF1* gene may play central roles in the development of lower digestive tract.

Key words: *Haliotis diversicolor*; settlement and metamorphosis; epidermal growth factor (EGF)-related protein; *HdEGF1* gene; lower digestive tract