

大珠母贝外套膜基因 PMMG1 的克隆、 表达及其特征分析

王玉梅^{1,2}, 夏建红¹, 黄桂菊¹, 喻达辉^{1*}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所海水养殖生态与质量控制农业部重点开放实验室, 广东广州 510300;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: EF-hand 结构域在真核生物细胞内钙离子吸收和运输中发挥重要作用, 在贝类中可能参与贝壳和珍珠质的形成。根据已报道的贝类中具有 EF-hand 结构域的碱基序列设计简并引物, 从大珠母贝外套膜 cDNA 文库中筛选得到 PMMG1 基因(大珠母贝外套膜基因 1)。PMMG1 基因全长 618 bp, 开放读码框编码 140 个氨基酸, N-端的 22 个氨基酸肽段为信号肽。PMMG1 氨基酸序列与合浦珠母贝 PFMG1 的一致性为 56%, 预测有两个 EF-hand 结构域。选取编码 PMMG1 成熟蛋白的 cDNA 序列插入 pET-32a 质粒构建表达载体, 通过 IPTG 诱导, Ni²⁺-NTA 亲和层析柱纯化, 成功获得预期大小的融合蛋白。凝胶电泳迁移率的变化证明 PMMG1 蛋白具有结合 Ca²⁺/Mg²⁺ 的活性, 组织特异性表达表明 PMMG1 基因在外套膜的表达量远高于其他组织。大珠母贝外套膜基因 PMMG1 的克隆与表达研究为进一步研究该蛋白在珍珠质矿化中的作用、探讨珍珠质形成的分子生物学机制奠定了一定基础。

关键词: 大珠母贝; PMMG1; EF-hand 结构域; 融合蛋白; 珍珠质

中图分类号: Q959.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2010)03-0121-08

1 引言

双壳类软体动物的贝壳, 尤其是位于贝壳内侧具有珍珠光泽的珍珠质(nacre)文石晶体, 由于它具有独特的纳米结构及优越的机械力学性能(mechanical performance), 近年来吸引了生物学家和材料学家的关注。尽管其主要成分为 CaCO₃(占珍珠质总质量的 95% 以上), 然而与天然的 CaCO₃ 晶体又有所不同。珍珠质的断裂阻力是无机成因文石晶体的 3 000 多倍^[1-2], 达到了强度和韧性的最佳配合。珍珠质中的 CaCO₃ 晶体是在贝类外套膜分泌的多种有机大分子的指导和参与下经过生物矿化形成的, 是 CaCO₃ 和有机成分的混合物, 形态结构和

生长方向都受到严格的控制^[3], 因此参与珍珠质 CaCO₃ 晶体形成的有机成分是关键因素。

具有 EF-hand 结构域的蛋白(EF-hand 蛋白)是钙离子结合蛋白之一, 在生物矿化中具有重要作用^[4-5]。在已报道的贝类中 EF-hand 蛋白包括合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)的 PFMG1^[6]、EFCBP^[7]、calmodulin (CaM)^[8] 和似 calmodulin 蛋白(CaLP)^[9] 以及珠母贝(*P. margaritifera*)的 calconectin^[10]。这些贝类的 EF-hand 蛋白也具有与脊椎动物的 EF-hand 蛋白类似的功能, 它能调控钙代谢, 进而参与调节贝壳和珍珠质的形成, 是影响珍珠质 CaCO₃ 晶体形成的有机成分之一。本研究以大珠母贝外套膜组织为材料, 开展 EF-hand 基因的同

收稿日期: 2009-04-13; 修订日期: 2010-03-10。

基金项目: 国家高新技术研究发展计划“八六三”项目(2006AA10A415); 广东省科技推广项目(A200701C02; A200899C04; A200900A07); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2007TS07; 2009YD02)。

作者简介: 王玉梅(1982—), 女, 山东省莱阳市人, 硕士研究生, 从事海洋生物技术研究。E-mail: yumei20081982@163.com

* 通信作者: 喻达辉, E-mail: pearlydh@163.com; pearlydh@163.com

源克隆、体外表达及表达产物与 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的结合特性研究,为进一步研究该蛋白质的功能、探讨珍珠质形成的生物学机制奠定基础。

2 材料与方法

2.1 材料

本研究材料大珠母贝采集于海南三亚热带水产研发中心,解剖后取外套膜,于液氮速冻后保存于一80℃的低温冰箱。

2.2 总 RNA 的提取和 SMART cDNA 的合成

取大珠母贝外套膜组织,加液氮浸泡并充分研磨,按照 SV Total RNA Isolation System (Promega) 操作手册提取总 RNA。按照 SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit(Clontech)操作手册合成大珠母贝外套膜 SMART cDNA。

2.3 中间片段的克隆

根据已知 EF-hand 保守序列^[6-7,10]设计合成一对简并引物 EF hand-F/EF hand-R(表 1)。以 EF hand-F/EF hand-R 为引物,SMART cDNA 的 100 倍稀释产物为模板,扩增 PMMG1 基因的中间片段。PCR 反应总体积为 20 μL ,包括 0.2 mmol/dm³ dNTP,1 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ 的引物,4 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ 的 MgCl_2 ,2 μL 10 \times buffer,0.5U 的 Taq 酶。用 Touchdown PCR 方法,程序如下:95℃ 5 min;95℃ 30 s,50~60℃ 30 s,72℃ 1.5 min,10 个循环,每个循环 Tm 降低 1℃;95℃ 30 s,52℃ 30 s,72℃ 1.5 min,20 个循环;72℃ 10 min。

表 1 大珠母贝 PMMG1 基因全长扩增及表达所用引物

引物	引物序列(5'-3')
EF hand-F	CNATHGTNWSNTGYAAYGCN
EF hand-R	CCRTCNGTRTTNSWRTCRTA
PMMG1-F	AACTGGAAGGTTTCAGGGAT
SMART-3	CAGAGTACT ₍₁₆₎
SMART-5	AACGCAGAGTACGCGGG
PMMG1-R	AATGACATGGATTCGCTGGA
Ex-PMMG1-F	GAGCTCAGAAAAAGGTGGTGGAGT
Ex-PMMG1-R	CTCGAGTTCGGGTTCTCTTCAC

注:F 为正向引物;R 为反向引物。

PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,用 AxyPrepTM DNA Gel Extraction Kit (AXYGEN) 对目的片段进行纯化,纯化产物与 pMD18-T 载体

(TaKaRa) 连接,转化到感受态大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Top10,经 PCR 鉴定后将阳性克隆送往上海英骏公司测序。

2.4 全长 cDNA 的克隆

根据双链 SMART cDNA 两端的接头设计 5' 和 3' 接头引物 SMART-5 和 SMART-3,根据中间片段序列设计特异性引物 PMMG1-F 和 PMMG1-R (表 1)。

3'RACE:以大珠母贝外套膜 SMART cDNA 为模板,以 PMMG1-F/SMART-3 为引物,PCR 反应程序为:95℃ 5 min;95℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 1.5 min,30 个循环;72℃ 10 min。

5'RACE:以大珠母贝外套膜 SMART cDNA 为模板,以 SMART-5/PMMG1-R 为引物,PCR 反应程序为:95℃ 5 min;95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 1.5 min,30 个循环;72℃ 10 min。

RACE PCR 产物经纯化回收后克隆到 pMD18-T 载体,转化到感受态 *E. coli* Top10,经 PCR 鉴定后将阳性克隆送往上海英骏公司测序。

2.5 序列与结构域分析

用 BLASTX^[11] 程序搜索同源基因,用 BLASTP^[11] 在 GenBank 中搜索同源蛋白并用 MegAlign 进行同源性比对。用 SignalP 3.0^[12] 预测信号肽序列,用 PSIPRED^[13] 预测蛋白质的二级结构,用 PROSITE^[14-17] 分析其结构域,通过 NetPhos 2.0^[18] 预测磷酸化位点。用 ClustalX^[19] 进行多序列比对,并用 MEGA3.1^[20] 构建进化树。

2.6 原核表达载体的构建

根据目的基因序列和表达载体 pET-32a 的多克隆位点序列设计引物,5' 引物 Ex-PMMG1-F 含 SacI 酶切位点,3' 引物 Ex-PMMG1-R 含 XhoI 酶切位点(表 1)。以大珠母贝外套膜 SMART cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,用 AxyPrepTM DNA Gel Extraction Kit (AXYGEN) 对目的片段进行纯化,纯化产物与 pMD18-T 载体 (TaKaRa) 连接构建 pMD18-T-PMMG1 质粒,转化到感受态 *E. coli* Top10 中,PCR 筛选阳性克隆,测序确认后,提取质粒 pMD18-T-PMMG1,经 SacI 和 XhoI 双酶切,回收目的片段,连接到原核表达载体 pET-32a 上,获得重组表达质粒 pET-32a-PMMG1,转化于表达受体菌 *E. coli* BL21(DE3),PCR 筛选阳性克隆,测序确认序列的正确性。

2.7 原核表达与纯化

将菌株 BL21 (DE3)/pET-32a 单菌落按 1 : 100 的比例接种于 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养至指数增长后期, 加入 IPTG 至终浓度 10 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, 室温诱导过夜, 同时设阴性对照。在冰浴中超声波破碎菌液, 18 000 r/min 离心后分别收集上清液和沉淀, 加入 2 \times 凝胶上样缓冲液混匀, 100 °C 水中煮沸 5 min, 12% SDS-PAGE 电泳分析。

将超声波破碎的诱导菌液上清液通过 His 结合树脂 Ni-NTA His · Bind Resins (Novagen), 使表达的蛋白结合至 His 结合树脂上, 经漂洗缓冲液洗涤后, 以 60~250 mmol/dm³ 的咪唑梯度洗脱缓冲液 (60~250 mmol/dm³ 咪唑, 0.5 mol/dm³ NaCl, 20 mmol/dm³ Tris-HCl pH8.0) 洗脱融合蛋白, 分段收集洗脱液经 12% SDS-PAGE 电泳检测其纯度和浓度。洗脱液经透析去盐和咪唑, 保存于 4 °C。

2.8 PMMG1 蛋白的 Ca²⁺/Mg²⁺ 结合实验

PMMG1 蛋白的 Ca²⁺/Mg²⁺ 结合实验参照 Burgess 等^[21] 的方法。取纯化的 PMMG1 蛋白样品, 分别加入 EGTA, CaCl₂ 和 MgCl₂ 溶液至终浓度为 10 mmol/dm³, 加入 2 \times 凝胶上样缓冲液混匀, 100 °C 水中煮沸 5 min。12% SDS-PAGE, 120 V 电泳 4 h, 其中在电泳 EGTA-PMMG1, CaCl₂-PMMG1 和 MgCl₂-PMMG1 样品的电泳缓冲液和凝胶中分别加入 EGTA, CaCl₂ 和 MgCl₂ 溶液至终浓度为 0.1 mmol/dm³。用 Gelpro32 软件分析 SDS-PAGE 电泳结果。

2.9 组织特异性表达

分别以大珠母贝肌肉、鳃、内脏团、性腺和外套膜 sscDNA (单链 cDNA) 为模版, 以 β -actin 和 Ex-PMMG1-F/Ex-PMMG1-R 引物进行 PCR 扩增。用琼脂糖电泳对 PCR 产物进行检测, 并用 Band-Scan5.0 软件进行半定量分析。

3 结果与分析

3.1 PMMG1 cDNA 的克隆与序列分析

根据已知 EF-hand 保守序列设计简并引物 EF hand-F / EF hand-R, 扩增得到 231 bp 的 cDNA 片段。分析 BLAST 表明该片段与 GenBank 中已知的合浦珠母贝基因 PFMG1 (GenBank 登录号 DQ104255) 具有较高同源性 (59%)。利用 3' RACE 技术获得了 445 bp 的片段, 该片段包含终止密码子 TAA 和 24 个碱基的 poly(A)。利用 5' RACE 技术获

得了 428 bp 的片段, 该片段包含起始密码子 ATG。将 3' RACE 和 5' RACE 获得的片段进行拼接获得了此基因的全长 (图 1)。因与合浦珠母贝基因 PFMG1 (*P. fucata* mantle gene 1) 的同源性最高, 并且也含有 EF hand 结构域, 因而命名为 PMMG1 (*P. maxima* mantle gene 1, GenBank 登录号 FJ386386)。PMMG1 的 cDNA 序列全长 618 bp, 包括 423 bp 的开放阅读框 (ORF), 49 bp 的 5' UTR (5' 非翻译区) 和 146 bp 的 3' UTR (3' 非翻译区), 具有真核生物典型的加尾信号 AATAAA 和 Poly(A) 尾。ORF (开放阅读框) 编码 140 个氨基酸, 推测分子量为 16.0 \times 10³ u, 理论等电点为 5.06, 其中 N-端有一段长 22 个氨基酸的信号肽, 不含信号肽的成熟蛋白由 118 个氨基酸残基组成, 推测分子量为 13.5 \times 10³ u, 理论等电点为 4.79。分析氨基酸组成表明, 组成 PMMG1 蛋白的主要氨基酸残基为 Glu (10%) 和 Lys (10%), 只有 1 个 His 和 2 个 Pro 残基。推测 Cys77 和 Cys135 可以形成分子内的二硫键。

```

1  AAGATCGATTGATATTTTACAACCAACAACTATAAAGAACTTGCAACTTTTATGAAGATG
1  M K M
61  AGGTACCTGACGATTATAGCAGCGATTCTTTTTGTGCCACCTGTATCATGTCNAATGCTAGA
4  R Y L T I A A I L F V T I V S C N A R
121  AAAAGGTGGTGGAGTAGGGCCAAAAGACAGTGTGAATCAAAACCGGAGGTGGCAAGGGA
24  K R W W S R A K K T V G I K P E V G K G
181  GGAAACTGGAAGGTTCAAGGATCATTAACTATCTCATGTGCCAAGAAAGAGAGACAGAG
44  G N W K V Q G S L T I S W R K K R D T E
241  GATCAGGGGAAATACAACGTAATGTTAGCTTTGAACCAATGTGACCTTGAGTCTCATATGAC
64  D Q G K Y N V M L A L N Q C D L E S Y D
301  AGTAACACAGATGGGGCAGTCAAGCTTGATGATATAGAAGAGATATTTTATCATACAGAG
84  S N T D G A V K L D D I E E I F Y H T E
361  TTATCAAAACTGTTCTTTGAAGAAGCAGATGCAAAACAAGACCGTGAAATATCATCAAGC
104  L S K L F F E E A D A N K D G E I S S S
421  GAATTGATGCTCTCTCAACAATATAAAGGATGTGAAGAGGAACCCGAAATAAAACATG
124  E F D V F S T N I K G C E E E P E *
481  AACAAATTTTATTTGTCAACGTTAAACAATAGGAAATCCATGTAGTAAAATCCTTGGCCAC
541  TCACAGTAAACAGTTACTTCAAACGTTGTTATACAATAGTTTACTTTTTTAAAGGCAAAA
601  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 大珠母贝 PMMG1 基因的 cDNA 序列和推测的氨基酸序列

下划线表示信号肽, 阴影表示 EF-hand 模块, 方框表示加尾信号, 圆圈表示形成二硫键的半胱氨酸

用 BLASTP 在 GenBank 中搜索同源性蛋白并用 MegAlign 进行同源性比对, 结果显示 PMMG1 氨基酸序列和合浦珠母贝中的钙结合蛋白 PFMG1 (56%)、PFMG7 (GenBank 登录号 DQ104261) (56%) 和 PFMG6 (GenBank 登录号 DQ104260)

(55%)具有较高的同源性,与合浦珠母贝中的 EF-CBP(GenBank 登录号 DQ494416)(25%)的同源性较低。PMMG1 和以上几种蛋白都有信号肽和 EF-hand 结构,基于此,认为 PMMG1 是一种分泌型的钙结合蛋白,推测其由大珠母贝外套膜合成后分泌至外套腔,从而参与贝壳或珍珠质的形成过程。

3.2 二级结构预测

SignalP 3.0 预测显示 PMMG1 蛋白第 1~22 个氨基酸残基为一段信号肽,用 PROSITE 搜索蛋白结构域表明,第 83~94 和第 113~124 个氨基酸残基分别为 EF-hand 模块。预测其成熟蛋白的二级结构(图 2)包含 4 个 α 螺旋(33.9%)、4 个 β 折叠(13.6%)和无规卷曲(52.5%),这与 PFMG1 成熟蛋白的二级结构具有很高的相似性。

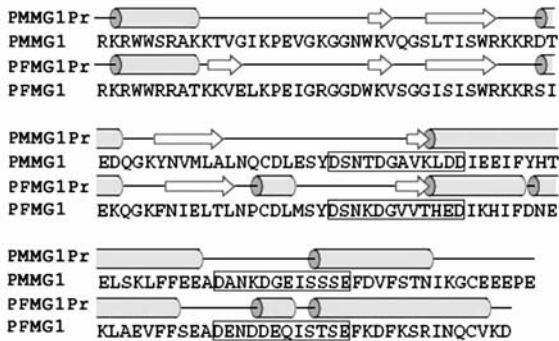


图 2 PMMG1 蛋白和 PFMG1 蛋白二级结构的比较
圆筒表示 α 螺旋,箭头表示 β 折叠,线形表示无规卷曲,方框表示 EF-hand 模块。PMMG1 Pr 为 PMMG1 蛋白的二级结构,PMMG1 为 PMMG1 的氨基酸序列,PFMG1 Pr 为 PFMG1 蛋白的二级结构,PFMG1 为 PFMG1 氨基酸序列

通过 NetPhos 2.0 对氨基酸序列的磷酸化位点进行预测,发现 PMMG1 蛋白含有 8 个潜在的磷酸化位点,包括 5 个 Ser 位点(Ser55, Ser84, Ser121, Ser122, Ser123)、2 个 Tyr(Tyr68, Tyr82)位点和 1 个 Thr 位点(Thr62)。

3.3 同源性比较和系统发生分析

2 个 EF-hand 模块及其之间的序列称为 EF-hand 签名序列(EF-hand signature)。PMMG1 蛋白的 EF-hand 签名序列与 PFMG1, PFMG6, EF-CBP, 似 calmodulin 蛋白、calconectin, calmodulin (*Patinopecten* sp.) 和 calmodulin (*Pinctada fucata*) 中的 EF-hand 签名序列具有较高的相似性(图 3),一致性分别为 52%, 52%, 31%, 26%, 24%、24% 和 21%。根据 EF-hand 签名序列构建双壳贝类中 EF-hand 蛋白的系统进化树,分析系统发生表明 PMMG1 与 PFMG1 和 PFMG6 进化关系最近,与 EFCBP, 似 calmodulin 蛋白, calconectin, calmodulin (*Patinopecten* sp.) 和 calmodulin (*Pinctada fucata*) 则较远(见图 4)。

3.4 PMMG1 基因的原核表达和表达产物的纯化

重组的 pET-32a-PMMG1 质粒能在 BL21 (DE3) 中高效表达。pET-32a 载体表达的蛋白质分子量约为 20×10^3 u, PMMG1 成熟蛋白质分子量为 13.5×10^3 u。通过对表达产物 SDS-PAGE 分析表明,在约 33.5×10^3 u 处呈现清晰的融合蛋白条带,与预测的相符(见图 5)。



图 3 双壳贝类中 EF-hand 结构域氨基酸比较

方框表示 EF-hand 模块,Ps-CaM 表示扇贝的 calmodulin 基因(GenBank 登录号 P02595),Pf-CaM 表示合浦珠母贝的 calmodulin 基因(AY341376),Pf-CaLP 表示合浦珠母贝的似 calmodulin 蛋白基因(AY663847),Pmg-Cal 表示珠母贝的 calconectin 基因(DQ352042),Pf-EFCBP 表示合浦珠母贝的 EFCBP 基因(DQ494416),Pf-PFMG1 表示合浦珠母贝的 PFMG1 基因(DQ104255),Pf-PFMG6 表示合浦珠母贝的 PFMG6 基因(DQ104260),Pm-PMMG1 表示大珠母贝的 PMMG1 基因(FJ386386)

3.5 PMMG1 的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 结合实验

通过 Gelpro32 软件分析 PMMG1, PMMG1 +

EGTA, PMMG1 + CaCl_2 和 PMMG1 + MgCl_2 条带的分子量分别为 33.1×10^3 , 33.5×10^3 , 32.2×10^3

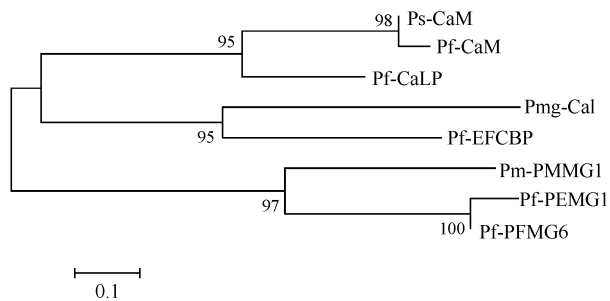


图4 双壳贝类中含 EF-hand 结构域的蛋白质的进化关系
比例尺 0.1 表示进化距离

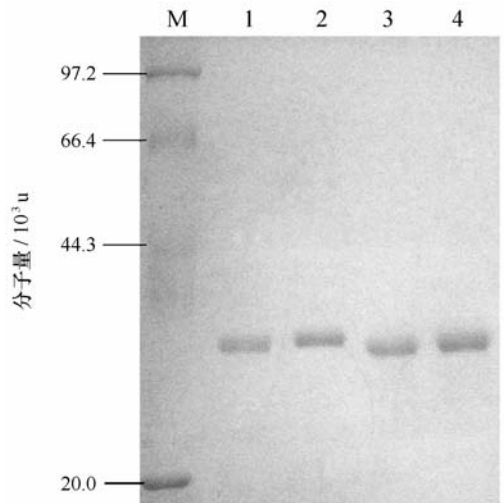


图6 PMMG1 蛋白与钙、镁结合的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白质分子量标准, 1. PMMG1, 2. PMMG1+EGTA, 3. PMMG1+CaCl₂, 4. PMMG1+MgCl₂

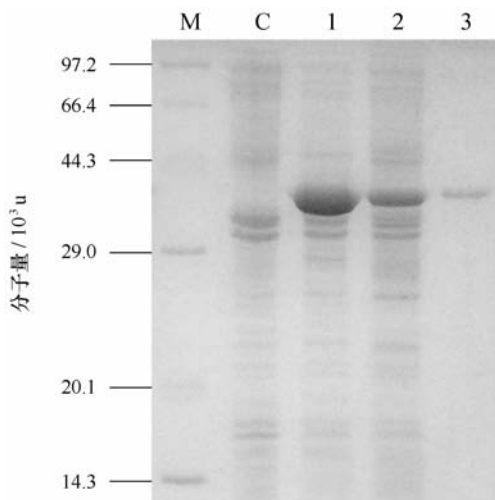


图5 PMMG1 融合蛋白表达和纯化的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白质分子量标准, C. 未诱导菌液, 1. 诱导菌液, 2. 诱导菌液超声波破碎上清液, 3. 纯化的 PMMG1 融合蛋白

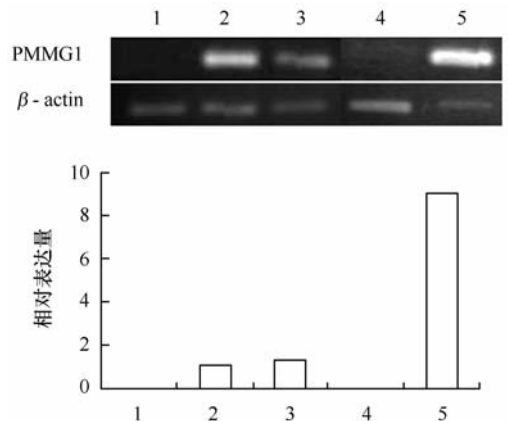


图7 PMMG1 在不同组织中的相对表达量

1. 肌肉, 2. 鳃, 3. 内脏团, 4. 性腺, 5. 外套膜

和 32.5×10^3 u, 可见在 Ca^{2+} , Mg^{2+} 存在的情况下, PMMG1 蛋白的电泳迁移较快(图6), 这可能与 PMMG1 蛋白结合 Ca^{2+} / Mg^{2+} 后的构象变化以及正电荷的增加有关, 并且表明 PMMG1 与 Ca^{2+} , Mg^{2+} 具有一定的结合能力。

3.6 组织特异性表达

半定量 RT-PCR 显示 PMMG1 蛋白在鳃、内脏团和外套膜中表达, 并且在外套膜的表达量远远高于鳃和内脏团(图7), 而外套膜上皮细胞通常被认为是形成贝壳和珍珠层的基质有机分子的来源^[22-23]。

4 讨论

EF-hand 结构域(EF-hand domain)是一种常见的 Ca^{2+} 结合结构域, 参与包括生物矿化在内的许多

生化过程。典型的 EF-hand 结构域由 29 个氨基酸组成, 基本功能结构域是一种螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix)结构, 通常成对出现^[24-25], 其中序列保守的环通常由 12 个氨基酸残基组成, 称为 EF-hand 模块(EF-hand motif)。大珠母贝 PMMG1 基因和合浦珠母贝 PFMG1 基因相比, 开放阅读框的核苷酸一致性为 68%, 氨基酸序列一致性为 56%, 两者在 N 端都有一段 22 个氨基酸的信号肽, 靠近 C 端都有 2 个 EF-hand 结构域。二级结构预测显示, PFMG1 的一对 EF-hand 结构域两侧都有 α -螺旋, 而 PMMG1 只有 EF2 结构域两侧是 α -螺旋, EF1 结构域只有环-螺旋结构。螺旋-环-螺旋结构通常是钙

结合活性的标志^[26],螺旋结构在提高 EF-hand 的 Ca^{2+} 亲和力方面起很重要的作用,并且 α -螺旋疏水性的增强有利于加强蛋白质核心的稳定性^[27]。PMMG1 的 EF1 结构域明显缺少一个 α -螺旋,并且疏水性氨基酸含量也低于 PFMG1 的 EF1,推测其 Ca^{2+} 亲和力低于 PFMG1 的 EF1。在 PFMG1 的 EF2 模块中部出现一个小的 α -螺旋结构,它在一定程度上影响了 EF2 的环形结构,其疏水性氨基酸含量也低于 PMMG1 的 EF2,并且 PFMG1 EF2 模块的第二位氨基酸 Glu 带有负电荷,它可能对 α -螺旋产生失稳效应^[28]。因此,推测 PMMG1 的 EF2 结构域比 PFMG1 的 EF2 对 Ca^{2+} 有更强的结合能力,这从某种角度上部分解释了大珠母贝与合浦珠母贝之间珍珠质形成速度和质量差异的原因。

EF-hand 模块具有结合 Ca^{2+} ^[26] 或 Mg^{2+} ^[29-30] 的活性,其亲和力大小在很大程度上是由 EF-hand 模块的序列所决定的。PMMG1 蛋白的 Cys77 和 Cys135 可形成分子内二硫键,将 EF-hand 模块两端连结起来,缩小了原子间协同作用的空间距离,形成一种更有利于结合 Ca^{2+} 的结构^[31]。典型的 EF-hand 模块第 1,3,5,7,9 和 12 位氨基酸残基侧链或主链上的 7 个氧配体形成五角锥体,EF-hand 通过这 7 个氧配体可以螯合一个 Ca^{2+} ,其中第 1,3,5 位氨基酸残基(通常为 Asp)通过侧链上的氧提供一价配位,第 7 位氨基酸残基通过主链上的氧直接结合 Ca^{2+} ,第 9 位氨基酸残基的氢结合 1 个水分子,通过水分子提供 Ca^{2+} 的配位点,第 12 位氨基酸残基(很保守,几乎总是 Glu)通过侧链上的两个氧作为二价配体^[32-33]。PMMG1 中的两个 EF-hand 都属于典型的 EF-hand 模块,第 1,3,5 位的残基 Asp, Asn, Asp 通过侧链的氧提供配位点,第 7 位的残基 Ala/Glu 通过主链上的氧直接结合 Ca^{2+} ,第 9 位残基 Lys/Ser 的氢结合 1 个水分子,通过水分子提供

Ca^{2+} 的配位点,第 12 位的残基 Glu/Asp 通过侧链上的两个氧作为二价配体,其中 Glu 比 Asp 有更强的 Ca^{2+} 亲和力,因为 Glu 拥有比 Asp 更长的侧链,使两个配位的侧链氧在空间位置上更接近 Ca^{2+} ,从而形成更稳定的键^[33]。无论就 EF-hand 结构域的二级结构还是就 EF-hand 模块的 Ca^{2+} 结合相关氨基酸而言,EF2 结构域都比 EF1 具有更强的 Ca^{2+} 亲和力。

EF-hand 蛋白存在于细菌、植物和动物等多种生物体内^[34],参与包括钙的缓冲、运输、信号转换^[35] 和肌肉收缩^[36] 在内的许多生物过程。在 PMMG1 蛋白与 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 结合的实验中,加入 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的电泳迁移率比加入 EGTA 的略高,表明 PMMG1 蛋白结合了一定量的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$,与 Li 等^[37-38] 的结果一致。正是 SDS 变性剂影响了 PMMG1 与 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的结合,否则其电泳迁移率差异可能还会更明显。在生物矿化过程中, Mg^{2+} 的存在促进了体内无定形碳酸钙的稳定性^[39]。并且海洋软体动物文石层的形成也与外套膜外液(extrapallial fluid)中较高的 Mg^{2+} 浓度有关^[40]。Duplat 等^[10] 认为方解石晶体和文石晶体生物矿化的发生依赖于 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 浓度的平衡,当 calconectin 蛋白结合 Ca^{2+} 时生物矿化形成方解石晶体,结合 Mg^{2+} 时则形成文石晶体。同样,PMMG1 蛋白也具有 Ca^{2+} , Mg^{2+} 的结合活性,因此它既可参与方解石晶体的形成,也可参与文石晶体的形成,但在何种情况下结合 Ca^{2+} ,在何种情况下结合 Mg^{2+} ,其调控机制有待进一步研究。

PMMG1 基因主要在外套膜中表达,其克隆与表达研究为进一步研究该蛋白在珍珠质矿化中的作用、探讨珍珠质形成的分子生物学机制奠定了一定基础。

参考文献:

- [1] CURRY J D. Mechanical properties of mother of pearl in tension[J]. Proc R Soc Lond B, Biol Sci, 1977, 196(1125):443—463.
- [2] JACKSON A P, VINCENT J F V, TURNER R M. The mechanical design of nacre[J]. Proc R Soc Lond B, Biol Sci, 1988, 234(1277): 415—440.
- [3] SMITH B L, SCHAFFER T E, VIANI M, et al. Molecular mechanistic origin of the toughness of natural adhesives, fibres and composites[J]. Nature, 1999, 399(6738):761—763.
- [4] BELLIDO T, HUENING M, RAVAL-PANDYA M, et al. Calbindin-D28k is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity[J]. J Biol Chem, 2000, 275(34): 26328—26332.
- [5] WENDEL M, SOMMARIN Y, BERGMAN T, et al. Isolation, characterization, and primary structure of a calcium-binding 63-kDa bone

- protein[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(11):6125—6133.
- [6] LIU H, LIU S, GE Y, et al. Identification and characterization of a biomineralization related gene PFMG1 highly expressed in the mantle of *Pinctada fucata*[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(3): 844—851.
- [7] HUANG J, ZHANG C, MA Z, et al. A novel extracellular EF-hand protein involved in the shell formation of pearl oyster[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1770(7): 1037—1044.
- [8] LI S, XIE L, ZHANG C, et al. Cloning and expression of a pivotal calcium metabolism regulator: calmodulin involved in shell formation from pearl oyster (*Pinctada fucata*)[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2004, 138(3):235—243.
- [9] LI S, XIE L, MA Z, et al. cDNA cloning and characterization of a novel calmodulin-like protein from pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *FEBS J*, 2005, 272(19): 4899—4910.
- [10] DUPLAT D, PUISSEGUR M, BEDOUE T, et al. Identification of calconectin, a calcium-binding protein specifically expressed by the mantle of *Pinctada margaritifera*[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(10): 2435—2441.
- [11] WHEELER D L, CHAPPEY C, LASH A E, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information[J]. *Nucl Acids Res*, 2000, 28(1):10—14.
- [12] EMANUELSSON O, BRUNAK S, VON HEIJNE G, et al. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools[J]. *Nature protocols*, 2007, 2(4): 953—971.
- [13] JONES D T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices[J]. *J Mol Biol*, 1999, 292(2):195—202.
- [14] BAIROCH A. PROSITE:a dictionary of sites and patterns in proteins[J]. *Nucl Acids Res*, 1991, 19 (Suppl):2241—2245.
- [15] BAIROCH A. PROSITE:a dictionary of sites and patterns in proteins[J]. *Nucl Acids Res*, 1992, 20 (Suppl): 2013—2018.
- [16] BAIROCH A, BUCHER P, HOFMANN K. The PROSITE database, its status in 1997[J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 25(1): 217—221.
- [17] BERND H A, REHM, Frank Reinecke. *Medical Biomethods Handbook*[M]. New Jersey:Humana Press, 2005: 387—407.
- [18] BLOM N, GAMMELTOFT S, BRUNAK S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites[J]. *J Mol Biol*, 1999, 294(5):1351—1362.
- [19] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 25(24): 4876—4882.
- [20] KUMAR S, GADAGKAR S R. Disparity index: a simple statistic to measure and test the homogeneity of substitution patterns between molecular sequences[J]. *Genetics*, 2001, 158(3):1321—1327.
- [21] BURGESS W H, JEMIOLO D K, KRETSINGER R H. Interaction of calcium and calmodulin in the presence of sodium dodecyl sulfate [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1980, 623(2): 257—270.
- [22] LOWENSTAM H A, WEINER S. *On Biomineralization*[M]. Oxford:Oxford University Press, 1989.
- [23] SIMKISS K, WILBUR K M. *Biomineralization; Cell Biology and Mineral Deposition*[M]. San Diego:Academic Press, 1989.
- [24] McPHALEN C A, STRYNADKA N C, JAMES M N. Calcium-binding sites in proteins; a structural perspective[J]. *Adv Protein Chem*, 1991, 42:77—144.
- [25] STRYNADKA N C, JAMES M N. Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins[J]. *Annu Rev Biochem*, 1989, 58: 951—998.
- [26] KRETSINGER R H. Evolution and function of calcium-binding proteins[J]. *Int Rev Cytol*, 1976, 46: 323—393.
- [27] KRAGELUND B B, JONSSON M, BIFULCO G, et al. Hydrophobic core substitutions in calbindin D9k; effects on Ca²⁺ binding and dissociation[J]. *Biochemistry*, 1998, 37(25):8926—8937.
- [28] SHAW G S, HODGES R S, SYKES B D. Probing the relationship between α -helix formation and calcium affinity in troponin C: 1H NMR studies of calcium binding to synthetic and variant site III helix-loop-helix peptides[J]. *Biochemistry*, 1991, 30(34): 8339—8347.
- [29] DAVIS J P, RALL J A, REISER P J, et al. Engineering competitive magnesium binding into the first EF-hand of skeletal troponin C [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(51): 49716—49726.
- [30] ERICKSON J R, MOERLAND T S. A competition assay of magnesium affinity for EF-hand proteins based on the fluorescent indicator magnesium green[J]. *Anal Biochem*, 2005, 345(2): 343—345.
- [31] LE CLAINCHE L, PLANCQUE G, AMEKRAZ B, et al. Engineering new metal specificity in EF-hand peptides [J]. *J Biol Inorg Chem*, 2003, 8(3): 334—340.
- [32] GIFFORD J L, WALSH M P, VOGEL H J. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs[J]. *Biochem J*, 2007, 405(2): 199—221.
- [33] NELSON M R, CHAZIN W J. Structures of EF-hand Ca²⁺-binding proteins; diversity in the organization, packing and response to Ca²⁺ binding[J]. *Biometals*, 1998, 11(4):297—318.
- [34] KAWASAKI H, NAKAYAMA S, KRETSINGER R H. Classification and evolution of EF-hand proteins[J]. *Biometals*, 1998, 11(4): 277—295.

- [35] SKELTON N J, KORDEL J, AKKE M, et al. Signal transduction versus buffering activity in Ca^{2+} -binding proteins[J]. *Nat Struct Biol*, 1994, 1(4): 239—245.
- [36] HOLMES K C. Muscle proteins—their actions and interactions[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1996, 6(6):781—789.
- [37] LI S, XIE L, ZHANG C, et al. Cloning and expression of a pivotal calcium metabolism regulator: calmodulin involved in shell formation from pearl oyster (*Pinctada fucata*) [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2004, 138(3): 235—243.
- [38] LI S, XIE L, MZ Z, et al. cDNA cloning and characterization of a novel calmodulin-like protein from pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *FEBS J*, 2005, 272(19):4899—4910.
- [39] AIZENBERG J, LAMBERT G, WEINER S, et al. Factors involved in the formation of amorphous and crystalline calcium carbonate: a study of an ascidian skeleton[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(1):32—39.
- [40] KITANO Y, HOOD D W. Calcium carbonate crystal forms formed from sea water by inorganic processes [J]. *J Oceanogr Soc Japan*, 1962, 18(3):141—145.

Cloning, expression and characterization of *Pinctada maxima* mantle gene 1

WANG Yu-mei^{1,2}, XIA Jian-hong¹, HUANG Gui-ju¹, YU Da-hui¹

(1. Key Laboratory of Ministry of Agriculture for Mariculture, Ecology and Quality Control, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: EF-hand motif plays essential roles in the absorption and transportation of calcium ion in eukaryotic cells, and is possibly involved in the formation of shell and nacre in oysters. Degenerated primers were designed according to the conserved sequences of reported EF-hand proteins in oysters, and a novel gene PMMG1 (*Pinctada maxima* mantle gene 1) was screened from the mantle cDNA library of *P. maxima*. The PMMG1 cDNA contained 618 nucleotides and encoded 140 amino acids (aa), including a putative signal peptide of 22 aa. PMMG1 protein shared an identity of 56% with PFMG1 from *P. fucata* and had two putative EF-hand motifs. The cDNA fragment encoding mature protein of PMMG1 was cloned and integrated into prokaryotic expression vector pET32-a. A recombinant protein of expected size was induced by IPTG and then purified by Ni^{2+} -NTA resin. Electrophoretic shift experiment revealed that the PMMG1 protein could bind both Ca^{2+} and Mg^{2+} ion, and the tissue-specific expression level of PMMG1 was much higher in mantle than in other tissues, which may be involved in the formation of calcite while binding Ca^{2+} or the formation of aragonite while binding Mg^{2+} . This work can benefit the further investigation into the roles of EF-hand proteins in the biomineralization of pearl oysters.

Key words: *Pinctada maxima*; PMMG1; EF-hand domain; recombinant protein; nacre