

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180208003

http://www.yykxjz.cn/

赖卓欣, 刘雅, 王庆恒, 郑哲, 邓岳文. 马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*) *FBP*基因的克隆及其对温度胁迫的响应. 渔业科学进展, 2019, 40(2): 106-114

Lai ZX, Liu Y, Wang QH, Zheng Z, Deng YW. cDNA cloning of *FBP* gene in *Pinctada fucata martensii* and its response to temperature stress. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(2): 106-114

# 马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*) *FBP* 基因的克隆及其对温度胁迫的响应\*

赖卓欣<sup>1</sup> 刘雅<sup>1</sup> 王庆恒<sup>1,2</sup> 郑哲<sup>1,2</sup> 邓岳文<sup>1,2</sup>

(1. 广东海洋大学水产学院 湛江 524088; 2. 广东省珍珠养殖与加工工程技术研究中心 湛江 524088)

**摘要** 果糖-1,6-二磷酸酶(*FBP*)是催化糖异生过程中的限速酶,当动植物处于温度胁迫等不良环境条件时,*FBP*通过参与糖异生途径以维持机体的糖平衡,在动植物抗逆过程中起着重要作用。本研究通过 RACE 技术获得了马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*) *FBP*(*Pm-FBP*)基因 cDNA 全长,并使用实时荧光定量 PCR 技术检测了该基因在马氏珠母贝不同组织中的表达量,以及在 17°C(低温组)、22°C(对照组)、32°C(高温组)条件下鳃中的时序表达模式。序列分析显示,*Pm-FBP* 全长为 1381 bp,具有 54 bp 的 5' UTR 和 62 bp 的 3' UTR,开放阅读框(ORF)为 1020 bp,编码 339 个氨基酸,预测分子量为 37.13 kDa,等电点为 6.02。*Pm-FBP* 具有一个 Pfam *FBPase* 保守结构域,6 个潜在的 O-连接糖基化位点(Ser36、Ser56、Ser57、Ser76、Ser80 和 Thr115),1 个潜在的 N-糖基化位点,1 个金属结合位点(Asp-Pro-Ile/Leu-Asp-Gly/Ser-Thr/Ser)和 46 个磷酸化位点。多序列比对结果显示,*Pm-FBP* 与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)*FBP* 的相似性最高,为 83%;系统进化树显示,*Pm-FBP* 与长牡蛎等贝类聚为一支,然后再与其他软体动物聚为一大支,节肢动物和脊椎动物分别聚类,进化树总体聚为三大支。实时荧光定量结果显示,*Pm-FBP* 在所检测的闭壳肌、鳃、性腺、肝胰腺、足和外套膜等组织中均有表达,在性腺表达量最高,肝胰腺和鳃中有较高表达;对 *Pm-FBP* 时序表达的分析发现,*Pm-FBP* 在低温组和高温组实验时间范围内均出现先上升后下降的趋势,且在 72 h 时达到最大值,表明 *Pm-FBP* 参与了马氏珠母贝对温度胁迫的响应;在 120 h 时,高温组和低温组的 *Pm-FBP* 表达量均显著下降,表明 *Pm-FBP* 可能主要在短期的温度胁迫中发挥作用。本研究结果为进一步探索马氏珠母贝对温度胁迫的适应性提供了参考资料。

**关键词** 马氏珠母贝; 果糖-1,6-二磷酸酶基因; 温度胁迫; 表达分析; 基因克隆

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)02-0106-09

由非碳水化合物转变为葡萄糖或糖原的过程称为糖异生(Gluconeogenesis),糖异生是增加葡萄糖产生的一个主要途径(Cota-Ruiz *et al.*, 2015)。果糖-1,6-

二磷酸酶(Fructose 1,6-bisphosphatase, *FBP*)又称果糖 1,6-二磷酸酯酶,它催化果糖-1,6-二磷酸水解生成果糖-6-磷酸和无机磷,在糖的异生代谢过程中起关键性

\* 广东省海洋渔业科技与产业发展专项(Z2014009)和广东省科技计划(2017A030307024; 2017A030303076)共同资助 [This work was supported by Marine Fisheries Science and Industry Development Special Project of Guangdong Province (Z2014009), and Science and Technology Plan of Guangdong Province(2017A030307024; 2017A030303076)].

赖卓欣, E-mail: 582748856@qq.com

① 通讯作者: 王庆恒, 副教授, E-mail: wangqingheng@163.com

收稿日期: 2018-02-08, 收修改稿日期: 2018-03-16

的作用(Lozinska-Gabska *et al*, 2003; Kaiser *et al*, 1996)。FBP 几乎存在于所有生物体中, 包括细菌、真菌、植物和动物, 但不存在于有异源蛋白的古细菌中(Stec *et al*, 2000)。已有研究表明, 在高温、干旱(Xiao *et al*, 2014; 曲玲等, 2015)和缺氧(Cota-Ruiz *et al*, 2016)等非生物胁迫下, FBP 通过参与催化动植物体能量产生途径产生更多的能量, 在动植物体度过不良环境过程中起着重要的作用。第一个被人们所知的 FBP 序列全长是从小鼠(*Rattus norvegicus*)中克隆得到(el-Maghrabi *et al*, 1988)。已有关于部分水产经济动物 FBP 的研究报道, 如凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的肝胰腺具有糖异生的能力(Rosas *et al*, 1999); 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)在不同喂食情况下, 其 FBP 在各个组织中的表达量不同(Nie *et al*, 2015); 银鲫(*Carassius auratus gibelio*)被证实存在肝脏型和肌肉型 2 种 FBP 同工酶(王锐等, 2010)等。目前, 尚未有贝类 FBP 的报道。关于 FBP 在温度胁迫条件下的研究主要集中于植物(徐文亭等, 2013; 何斌等, 2015; 陈虎等, 2016; 曲玲等, 2015), 贝类 FBP 基因的相关功能有待进一步的研究。

贝类属于变温动物, 温度的变化对贝类的生命活动有显著的影响(Kim *et al*, 2009; Cotter *et al*, 2010; Ivanina *et al*, 2013)。马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*)又称合浦珠母贝, 是中国海水珍珠养殖的主要品种, 广泛分布于广东、广西和海南沿海等地, 具有重要的经济价值(田荣荣等, 2015)。昼夜温差的变化、一年四季的更替及无法控制的自然灾害带来的温度骤变都会对马氏珠母贝造成很大的负面影响。目前, 有关马氏珠母贝对温度变化的响应机制研究较少。本研究采用 RACE 技术获得 *Pm-FBP* 的基因序列全长, 并研究了其在不同温度下的时序表达模式, 以期为深入研究马氏珠母贝温度胁迫的响应机制提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究所用的马氏珠母贝采自广东省雷州市后洪村海区, 将贝体表面的附着物清理干净后运回实验室, 22℃暂养 2 d 后, 选取鳞片旺盛、活力正常的马氏珠母贝用于实验, 实验贝壳长为(69.23±3.80) mm。其中, 随机取 6 只马氏珠母贝的全组织, 包括闭壳肌、鳃、性腺、肝胰腺、足和外套膜, 经液氮速冻后置于-80℃冰箱备用。

150 只马氏珠母贝随机分为 3 组, 分别置于 3 个 300 L 的实验桶中, 微充气养殖, 水温分别设为 17℃(低温组)、22℃(对照组)和 32℃(高温组), 养殖过程中每天投喂等量的单胞藻, 每天换水 50%。在实验养殖开始后 6 h、24 h、72 h 和 120 h, 分别从每个实验桶中随机取 8 个个体, 剪取鳃组织, 经液氮速冻后置于-80℃冰箱保存。

### 1.2 主要试剂

Trizol、SYBR Select Master Mix 和 GeneJET Gel Extraction 购买于 Life Technologies 公司; DH5α 大肠杆菌(*Escherichia coli*)以及 RACE 试剂盒(Clontech)购买于 TaKaRa 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.3 *Pm-FBP* 全长克隆

**1.3.1 总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成** 采用 Trizol 法分别提取马氏珠母贝闭壳肌、鳃、性腺、肝胰腺、足和外套膜的总 RNA。3' RACE 和 5' RACE 模板的制备参考 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书。

**1.3.2 引物设计** 实验采用 Primer Premier 5.0 软件设计了实验所需引物, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列  
Tab.1 Primer sequences

引物 Primer	序列 Sequences (5'~3')	用途 Purpose
<i>Pm-FBP-F</i>	GTCATCAGCAGTGAGAAAGG	中间片段扩增 Middle fragment PCR
<i>Pm-FBP-R</i>	CCTGGGTACGCAAAGATA	中间片段扩增 Middle fragment PCR
5' inner Primer	CAGCGGTCTGAATGAAGT	5'RACE
5' outer Primer	TAGCCTGACGCAACCATC	5'RACE
3' inner Primer	TCCTAAAGGCAAACACTACG	3'RACE
3' outer Primer	ATCCAAAGAGTGGTAAGCC	3'RACE
<i>Pm-FBP</i> qRT-PCR-F	CCTGGGTACGCAAAGATA	qRT-PCR 分析 qRT-PCR analysis
<i>Pm-FBP</i> qRT-PCR-R	GCTTCGTCCCAGTATTGTT	qRT-PCR 分析 qRT-PCR analysis
β-actin-F	CGGTACCACCATGTTCTCAG	荧光定量(内参)Reference gene
β-actin-R	GACCGGATTCATCGTATTCC	荧光定量(内参)Reference gene

**1.3.3 RACE PCR 获得 *Pm-FBP* 全长序列** 利用引物 *Pm-FBP-F/Pm-FBP-R* 进行 *Pm-FBP* 中间片段的扩增。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 将与目的片段长度一致的 PCR 产物和载体 pMD18-T 连接, 连接产物转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 用氨苄青霉素选择培养基培养后, 挑取阳性菌送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序获得的 *Pm-FBP* 中间片段、3'和 5'序列与马氏珠母贝基因组(Du *et al.*, 2017)中已知的部分进行比对, 利用软件将获得的 *Pm-FBP* 中间片段与 3'和 5'的序列片段进行拼接, 最终得到 *Pm-FBP* 全长序列。

**1.3.4 *Pm-FBP* 的生物信息学分析** 利用 SMART 在线分析工具确定本研究克隆所得的 cDNA 序列为 *FBP* 基因; 利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列推导; ORF Finder 软件找到 *Pm-FBP* 的开放阅读框; ExPASy-ProtParam tool 进行氨基酸的理化性质分析(王玉红等, 2018); SignalP 4.1 软件进行信号肽的预测; TMHMM Server 软件分析氨基酸的跨膜结构(王修芳等, 2016); SWISS-MODEL 软件进行氨基酸三级结构分析(曲玲等, 2015); 通过多序列比对, 将 *Pm-FBP* 与部分已知物种的 *FBP* 氨基酸序列进行同源性分析; 利用 Mega 6.0 构建生物系统进化树(王竹青等, 2018)。

**1.3.5 *Pm-FBP* 在各组织以及不同温度下鳃中的时序表达差异** 本研究以  $\beta$ -actin 为内参基因, 利用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 *Pm-FBP* 基因在不同组织以及实验温度下各时间点的相对表达量, 分别以外套膜和 22 $^{\circ}\text{C}$  组为对照进行标准化处理以后, 利用 SPSS 软件以进行单因素方差分析(One-way ANOVA)、组间表达量均值比较和 Duncan 多重比较( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Pm-FBP* 序列分析

本研究通过 RACE 技术获得了 *Pm-FBP* 的全长序列。*Pm-FBP* 总长为 1381 bp, 5' UTR 为 54 bp, 3' UTR 为 62 bp, 开放阅读框(ORF)为 1020 bp, 编码 339 个氨基酸(图 1)。*Pm-FBP* 无信号肽, 无跨膜结构, 具有 *FBP* 保守的 *FBPase* 结构域, 1 个潜在的 N-糖基化位点, 6 个潜在的 O-连接糖基化位点(Ser36、Ser56、Ser57、Ser76、Ser80 和 Thr115), 46 个磷酸化位点。

### 2.2 *Pm-FBP* 理化性质分析

*Pm-FBP* 的理论分子量为 37.13 kDa, 等电点为 6.02。其中, 含量较高的氨基酸有 Gly (G) 8.8%, Ser (S) 8.6%, Leu (L) 8.0%; 带负电的残基总数(Asp+Glu)

```

1 actgcttcaacagat aaggcaggataaaggcgcttgaacaaagt tagaagacaATGTCG
1 M S
61 GGAACGAAGGTCT ATAGATACAGAGCTGTAACGCTCACCCGTTTATTCTGGCAGAA
3 G N E G P I D T E P V T L T R F I L A E
121 CAGAAGAAGCACCCC TCTGCAACAGGGGATTCTCCAGTTGGTGAACCTCATTACAGAC
23 Q K K H P S A T G D F S Q L V N F I Q T
181 GCTGTCAAAGCTGTG TCATCAGCAGTGAGAAAGGCTGGTATACATCGCTATATGGTATC
43 A V K A V S S A V R K A G I H R L Y G I
241 TCAGGTACACAGAAT GTCACAGGAGATGAACAGAAGAAGCTGGATGACTGGCAAATGAT
63 S G T Q N V T G D E Q K K L D V L A N D
301 TTGTTTATAACATG CTGAAATCATCACTGACATGTCTACTGGTTCAGAGGAGAAT
83 L F I N M L K S S Y L T C L L V S E E N
361 GATCAAGCCATAGTA GTAGAGACTGATAAACAGGGTAAATACATGTGGCATTGTACCCC
103 D Q A I V V E T D K Q G K Y I V A F D P
421 CTGGATGGTTCATC CAATATTGACTGTCTGGTGTCCATTGGTTCATATCTCTATATTC
123 L D G S S N I D C L V S I G S I F S I F
481 AGAAGAAAGATGAC TCACCTGTTCACAGAAGGATCGGTCACAGAAGGCTCTGAGATG
143 R K K D D S P V T Q K D A L Q K G S E M
541 GTTGGCTCAGGCTAC GCTTTATACGGCAGTCCACCATTGTTACTGGCCTGGAAGGT
163 V A S G Y A L Y G S A T M I V L A L E G
601 TCTGGGTCATGGT TTCATGTTAGATCCCGCTATGGAGAGTTTATCCTGACATTACCT
183 S G V N G F M L D P A I G E F I L T L P
661 AGCATTCAAATCAA CCGCGAGGAAAATATACTCCATCAATGAAGATATGAACAATAC
203 S I Q I K P R G K I Y S I N E G Y E Q Y
721 TGGGACGAAGCCACC AGGGAATATGTCAAAGTAAAAACATCAAAGAGTGGTAGCCA
223 W D E A T R E Y V K S K K H P K S G K P
781 TATGGAGCTCGTTAT ATAGGGTCTATGGTGGCTGATGTACACAGGACGTTGGTCTATGGT
243 Y G A R Y I G S M V A D V H R T L V Y G
841 GGTATCTTGGCTAC CCAGGTACATCTGAAGCTCTAAAGCAAACACTACGTTACTGTAT
263 G I F A Y P G T S E A P K G K L R L L Y
901 GAGAGTGACCCATG GCATTTATAATGGAACAAGCAGGAGGTTGTGCGTCAACGGGAAA
283 E S A P M A F I M E Q A G G C A S T G K
961 CAACGAATCCTTGACATTGAGCCTACAGATATACATCAGAGATGTCCTGTGTTACGGGA
303 Q R I L D I E P T D I H Q R C P V F M G
1021 TCCAAGGATGATGTT CAAGATGTACTGGATCTGTACAAAAGTACAGCAAATAGaaacgc
323 S K D D V Q D V L D L Y Q K Y S K *
1081 atacaatcaacactt gatgacaatagc caaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 *Pm-FBP* 的核苷酸序列分析

Fig.1 The nucleotide sequence analysis of *Pm-FBP*

5'和 3'非编码区用小写字母表示; 开放阅读框及推导的氨基酸序列用大写字母表示; 阴影部分为保守结构域 Pfam *FBPase*; 下划线表示 6 个 O-连接糖基化位点; 双下划线表示 N-糖基化位点; 加粗字体表示金属离子结合位点  
5' UTR and 3' UTR are indicated with small letters; Open reading frame and the deduced amino acid sequences are indicated with capital letters; The shaded portion is conserved domains of Pfam *FBPase*; The six O-linked glycosylation sites are underlined; Double underline denotes N-glycosylation site; The bold font represents the metal ion binding site

为 40 个, 正电的残基总数(Arg+Lys)为 37 个; 脂溶指数是 86.58, 平均亲水性(Grand average of hydropathicity, GRAVY)为-0.211, 为亲水性蛋白(图 2)。*FBP* 的二级结构预测结果显示,  $\alpha$  螺旋结构占整体的 30.97%,  $\beta$  转角为 11.50%, 延伸链为 22.71%, 无规则卷曲为 34.81%。

### 2.3 *FBP* 多序列比对及进化树构建

为确定 *Pm-FBP* 与其他物种的同源性, 将 *Pm-FBP*

与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)和果蝇(*Drosophila elegans*)的 FBP 序列进行比对,结果显示, Pm-FBP 与长牡蛎 FBP 相似度最高,为 83% (图 3)。对 Pm-FBP 进行三级结构的预测,与长牡蛎、虾夷扇贝 FBP 的三级结构进行比较分析,发现三者的相似性极高,都以不规则卷曲为主(图 4),说明 FBP 在三维结构上的保守性较高。

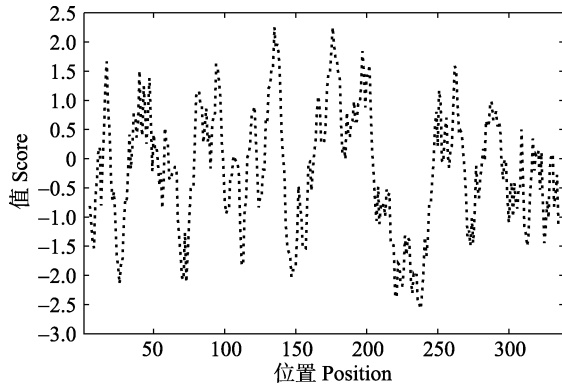


图 2 Pm-FBP 的疏水性

Fig.2 The hydrophobicity of Pm-FBP

将 Pm-FBP 与长牡蛎、虾夷扇贝、章鱼(*Octopus bimaculoides*)、海兔(*Aplysia californica*)、美洲鲎(*Limulus polyphemus*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、凡纳滨对虾、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、文昌鱼、锦龟(*Chrysemys picta bellii*)、鲮鱼(*Cyprinodon variegatus*)、红树林鲷鱼(*Kryptolebias marmoratus*)的 FBP 基因序列建立系统进化树,结果显示,FBP 先与长牡蛎、虾夷扇贝汇聚一支,再与其他软体动物汇聚成一支,节肢动物和脊椎动物分别汇聚成两支(图 5),这与传统的分类基本一致。

#### 2.4 Pm-FBP 在马氏珠母贝不同组织中的表达量检测

本研究通过实时荧光定量 PCR 技术检测 Pm-FBP 在马氏珠母贝闭壳肌、鳃、性腺、肝胰腺、足和外套膜的表达情况,结果如图 6 所示, Pm-FBP 基因在不同组织中表达量的变化从高到低依次为 GO>HE>GI>M>F>A, Pm-FBP 在性腺中表达量最高( $P<0.05$ ),其次是肝胰腺和鳃,足和外套膜的表达量较低,闭壳肌中几乎不表达。

#### 2.5 不同温度下马氏珠母贝鳃中 FBP 的时序表达

实验采用实时荧光定量 PCR 技术检测了 Pm-FBP 在鳃中的表达量,结果显示, Pm-FBP 在高温组和低温组的表达量都出现了先升高后降低的趋势,且均在 72 h 时达到最大值( $P<0.05$ ),由此可推测,

该基因与马氏珠母贝环境温度胁迫存在很强的相关性; 120 h 时,高温组和低温组 Pm-FBP 表达量均显著下降( $P<0.05$ ),说明 Pm-FBP 很可能主要在短期温度胁迫中起重要作用(图 7)。

### 3 讨论

本研究利用 RACE 技术克隆获得 Pm-FBP 全长序列,该基因全长为 1381 bp,共编码 339 个氨基酸。Pm-FBP 具有 FBP 共有的一个保守结构域 Pfam FBPAse(曲玲等, 2015; Cota-Ruiz *et al*, 2015),证实了本研究克隆所得到的序列为 Pm-FBP。FBP 是糖异生过程中的关键酶,受到异构调节、共价修饰和激素等机制的共同调节(王锐等, 2010)。其中,共价修饰又包括蛋白的磷酸化和去磷酸化(Wang *et al*, 2017)。Pm-FBP 中存在 46 个磷酸化位点、6 个 O-连接糖基化位点和 1 个 N-糖基化位点,也说明 FBP 可能通过蛋白质磷酸化修饰和糖基化来行使其蛋白功能(陈虎等, 2016)。此外, Pm-FBP 中存在 1 个 FBPAse 序列基序 DPLDGSS (Asp-Pro-Ile/Leu-Asp-Gly/Ser-Thr/Ser),此基序已被证明能够结合金属离子参与催化(York *et al*, 1995),与 FBPAse 需要金属离子催化的结论相符(Serrato *et al*, 2009; Rakus *et al*, 2013)。序列比对结果表明, Pm-FBP 与长牡蛎 FBP 同源性最高,为 83%; Pm-FBP 与长牡蛎、虾夷扇贝的 FBP 三级结构极为相似,说明 Pm-FBP 在双壳类动物进化过程中相对保守。

实时荧光定量 PCR 结果显示, Pm-FBP 在肝胰腺有较高水平的表达,与大菱鲆(Nie *et al*, 2015)、银鲫(王锐等, 2010)的研究结果一致。此外,研究表明,贝类处于繁殖期时,需要大量的能量储备用于精卵发育。在性腺发育过程中,贝体摄食获得的粗蛋白和粗脂肪含量随着精卵细胞的发育成熟不断增加,然后在休止期大量流失,糖类的含量在增殖期开始下降,成熟期达到最低,排放期后急剧升高,贝体饱满度及生化成分变化与繁殖周期的变化有着密切的关系(程亮等, 2013; Mendo *et al*, 2016)。本研究发现, Pm-FBP 在性腺中高表达( $P<0.05$ ),说明 FBP 作为能量产生途径的关键酶,可能参与了性腺发育过程中的能量提供。

温度胁迫对贝类生理代谢具有显著影响。研究表明,海水温度剧烈变化时,急剧的水温变化对虾夷扇贝(吴彪等, 2016; 高振锟等, 2017)、栉孔扇贝(*Azumapecten farreri*)(Jiang *et al*, 2017)和文蛤(*Meretrix meretrix* L)(冯建彬等, 2004)等海洋贝类的摄食能力、呼吸及排泄等均有较大影响。此外,温度能够直接影响贝体的新陈代谢活动,进而影响贝体的能量收支和生长过



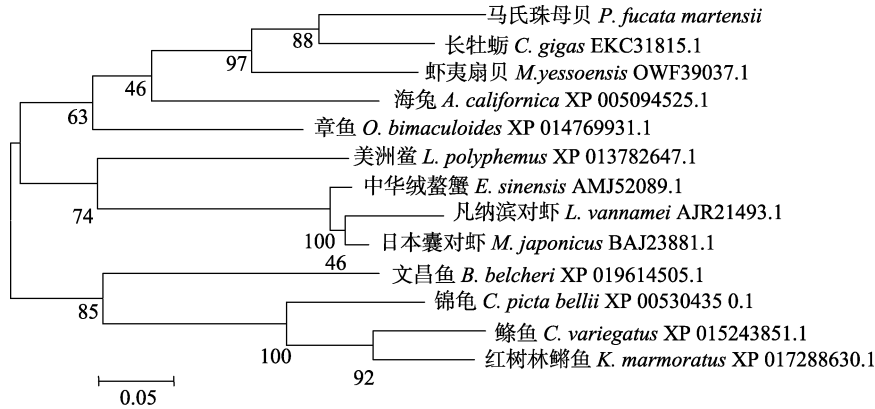


图 5 *Pm-FBP* 的系统进化树  
Fig.5 The phylogenetic tree of *Pm-FBP*

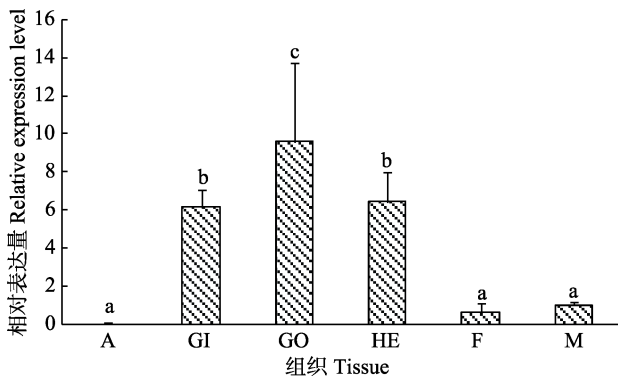


图 6 *Pm-FBP* 在马氏珠母贝不同组织中的表达分布  
Fig.6 *Pm-FBP* gene expression profiles in different tissues of *P. fucata martensii*

A: 闭壳肌; GI: 鳃; GO: 性腺; HE: 肝胰腺; F: 足; M: 外套膜。不同字母代表差异显著( $P<0.05$ ), 下同  
A: Adductor muscle; GI: Gill; GO: Gonads; HE: Hepatopancreas; F: Foot; M: Mantle. Different letters represent significant difference ( $P<0.05$ ), the same as below

程(姜妮妮等, 2017)。糖异生作用是在机体处于饥饿状态下, 各种非糖苷底物经过一系列酶促反应合成内源性葡萄糖的过程, 以保证机体的血糖处于正常水平(宫官等, 2013)。FBP 作为催化糖异生过程中的限速酶, 关于 FBP 应对温度胁迫的研究主要集中在植物(徐文亨等, 2013; 何斌等, 2015), 贝类中关于温度胁迫与 FBP 的关系尚未明确。鳃是贝类的重要的代谢器官, 具有呼吸和滤食等多种功能。作为与外界接触的器官, 水温的变化能够直接影响鳃的功能以及作用。本研究采用实时荧光定量 PCR 技术检测了 *Pm-FBP* 在低温组、对照组和高温组马氏珠母贝鳃的时序表达模式。结果表明, *Pm-FBP* 表达量在高温组和低温组都出现了先升高后降低的趋势, 且均在 72 h 时达到最大值( $P<0.05$ ), 由此可推测, 该基因与马氏珠母贝生存环境温度 and 胁迫存在很强相关性; 120 h

时高温组和低温组 *Pm-FBP* 表达量均显著下降( $P<0.05$ ), 这说明 *Pm-FBP* 很可能主要在短期温度胁迫中起重要作用。在植物体处于高温情况下, *FBP* 基因在短期会有一个应激上调的过程, 但在长期高温情况下, *FBP* 表达会趋于稳定(陈虎等, 2016; 曲玲等, 2015), 与本研究的高温组结果一致。推测贝体处于温度胁迫条件下, 机体代谢水平下降, 总糖含量处于较低水平, FBP 通过参与糖异生过程使马氏珠母贝机体的糖含量处于正常水平。本研究结果证明了 *Pm-FBP* 基因可能是马氏珠母贝在适应温度骤变环境过程中的重要基因, 为马氏珠母贝抗逆基因筛选以及温度胁迫响应机制的深入研究提供参考资料。

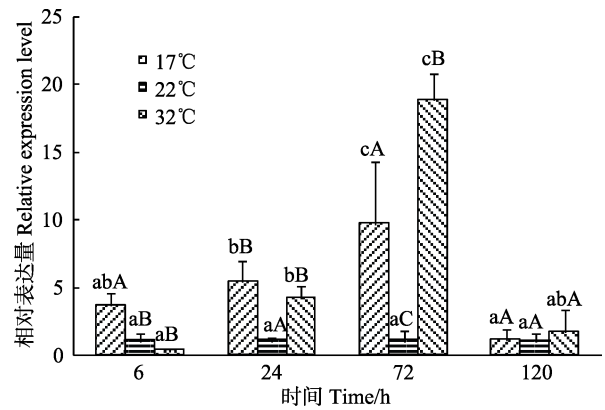


图 7 不同温度下马氏珠母贝鳃中 *Pm-FBP* 基因的时序表达  
Fig.7 Temporal expression of the *Pm-FBP* gene in the gills of *P. fucata martensii* at 17°C, 22°C, and 32°C

大写字母表示同一时间点、不同实验组间的 *Pm-FBP* 表达量的统计结果; 小写字母为不同时间点、相同实验组间 *Pm-FBP* 表达量的统计结果

Capital letters indicate the statistical results of *Pm-FBP* expression levels at the same time point in different experimental groups; Lowercase letters are the statistical results of the *Pm-FBP* expression levels in the same experimental group at different time points

## 参 考 文 献

- Chen H, Tan JH, Yan PD, *et al.* Cloning and expression analysis of *PmFBP* gene in *Pinus massoniana*. *Guangxi Forestry Science*, 2016, 45(1): 12–18 [陈虎, 谭健晖, 颜培栋, 等. 马尾松果糖-1,6-二磷酸酶基因克隆及表达模式分析. *广西林业科学*, 2016, 45(1): 12–18]
- Cheng L, Xu SL, Liu F *et al.* Study on the meat condition index and biochemical compositions of *Mytilus coruscus* in different gonad development stages. *Journal of Marine Sciences*, 2013, 31(4): 68–73 [程亮, 徐善良, 刘飞, 等. 厚壳贻贝性腺不同发育时期肥满度与生化成分分析. *海洋学研究*, 2013, 31(4): 68–73]
- Cota-Ruiz K, Leyva-carrillo L, Peregrino-Uriarte AB, *et al.* Role of HIF-1 on phosphofructokinase and fructose 1, 6-bisphosphatase expression during hypoxia in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Molecular & Integrative Physiology*, 2016, 198: 1–7
- Cota-Ruiz K, Peregrino-Uriarte AB, Felix-Portillo M, *et al.* Expression of fructose 1,6-bisphosphatase and phosphofructokinase is induced in hepatopancreas of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* by hypoxia. *Marine Environmental Research*, 2015, 106(1): 1–9
- Cotter E, Malham SK, O'keeffe S, *et al.* Summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of growth, biochemistry and gametogenesis. *Aquaculture*, 2010, 303(1–4): 8–21
- Du X, Fan G, Jiao Y, *et al.* The pearl oyster *Pinctada fucata martensii* genome and multi-omic analyses provide insights into biomineralization. *GigaScience*, 2017, 6(8): 1–12
- el-Maghrabi MR, Pilkis J, Marker AJ, *et al.* cDNA sequence of rat liver fructose-1,6-bisphosphatase and evidence for down-regulation of its mRNA by insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, 85(22): 8430–8434
- Feng JB, Wang MZ, Chen HC, *et al.* Effects of temperature and body size on oxygen consumption rate of *Meretrix meretrix*. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2004, 13(2): 126–129 [冯建彬, 王美珍, 陈汉春, 等. 温度和规格对文蛤耗氧率的影响. *上海水产大学学报*, 2004, 13(2): 126–129]
- Gao ZK, Zhang JH, Li M, *et al.* Effects of temperature fluctuation on physiological and immune parameters of scallop (*Patinopecten yessoensis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 148–154 [高振锟, 张继红, 李敏, 等. 温度波动对不同规格虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)生理和免疫指标的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 148–154]
- Gong G, Xue M, Wang J, *et al.* Cloning and sequence analysis of full-length cDNAs of key enzymes of gluconeogenesis in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(7): 1504–1518 [宫官, 薛敏, 王嘉, 等. 西伯利亚鲟糖异生途径关键酶基因全长 cDNA 的克隆和序列分析. *动物营养学报*, 2013, 25(7): 1504–1518]
- He B, Zhu JH, Long XY, *et al.* Cloning and expression analysis of a chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase gene in *Hevea brasiliensis*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2015, 36(3): 448–455 [何斌, 朱晋恒, 龙翔宇, 等. 巴西橡胶树叶绿体型果糖-1,6-二磷酸酶基因的全长 cDNA 克隆与表达分析. *热带作物学报*, 2015, 36(3): 448–455]
- Ivanina AV, Dickinson GH, Matoo OB, *et al.* Interactive effects of elevated temperature and CO<sub>2</sub> levels on energy metabolism and biomineralization of marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology*, 2013, 166(1): 101–111
- Jiang W, Jiang Z, Du M, *et al.* Physiological and biochemical responses of Zhikong scallop, *Chlamys farreri*, to different thermal stressors. *Aquaculture Research*, 2017, 48(9): 4783–4797
- Jiang WW, Fang JG, Li JQ, *et al.* Effects of temperature change on physiological and biochemical activities of *Haliotis discus hannai* Ino. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(2): 220–230 [姜妮妮, 方建光, 李加琦, 等. 温度胁迫对皱纹盘鲍生理和生化活动的影响. *中国水产科学*, 2017, 24(2): 220–230]
- Kaiser R, Olsson H, Erman M, *et al.* Fructose-1,6-bisphosphatase. Primary structure of the rabbit liver enzyme. 'Intermediate' variability of an oligomeric protein. *FEBS Letters*, 1996, 389(3): 249–252
- Kim M, Ahn IY, Cheon J, *et al.* Molecular cloning and thermal stress-induced expression of a pi-class glutathione S-transferase (GST) in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology*, 2009, 152(2): 207–213
- Lozinska-Gabska M, Dziewulska-Szwajkowska D, Szalagan E. Isolation of fructose-1,6-bisphosphatase from the foot muscle of a snail *Helix aspersa maxima*. *Zoologica Polonica*, 2003, 48(1–4): 81–91
- Mendo T, Semmens JM, Lyle JM, *et al.* Reproductive strategies and energy sources fuelling reproductive growth in a protracted spawner. *Marine Biology*, 2016, 163: 2
- Nie Q, Miao H, Miao S, *et al.* Effects of dietary glucose and dextrin on activity and gene expression of glucokinase and fructose-1,6-bisphosphatase in liver of turbot *Scophthalmus maximus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(3): 819–832
- Qu L, Xu Y, Ji DH, *et al.* Cloning and expression analysis of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase gene from *Pyropia haitanensis*. *Journal of Applied Oceanography*, 2015, 34(3): 402–410 [曲玲, 徐燕, 纪德华, 等. 坛紫菜细胞质型果糖 1,6-二磷酸酶基因的克隆及表达分析. *应用海洋学学报*, 2015, 34(3): 402–410]

- Rakus D, Gizak A, Kasprzak AA, *et al.* The mechanism of calcium-induced inhibition of muscle fructose 1,6-bisphosphatase and destabilization of glyconeogenic complex. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76669
- Rosas C, Martinez E, Gaxiola G, *et al.* The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaues setiferus* (Linnaeus) juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1999, 234(1): 41–57
- Serrato AJ, de Dios Barajas-López JD, Chueca A, *et al.* Changing sugar partitioning in FBPase-manipulated plants. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(10): 2923–2931
- Stec B, Yang H, Johnson KA, *et al.* MJ0109 is an enzyme that is both an inositol monophosphatase and the ‘missing’ archaeal fructose-1,6-bisphosphatase. *Nature Structural Biology*, 2000, 7(11): 1046–1050
- Tian RR, Tian QL, Du XD, *et al.* Molecular characterization and tissue specific expression of *SRF* gene from *Pinctada martensii*. *Genomics & Applied Biology*, 2015, 34(2): 272–278 [田荣荣, 田群莉, 杜晓东, 等. 马氏珠母贝 *SRF* 基因的分子特征及组织特异性表达. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(2): 272–278]
- Wang J, Wang Z, Ling B, *et al.* Identification of a potential proton donor to the linking oxygen atom in a three-metal ion assisted catalysis pathway catalyzed by fructose-1,6-bisphosphatase. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 2017, 73: 191–199
- Wang R, Xiao Q, Gui JF. Molecular cloning and expression analysis of fructose-1,6-bisphosphatase in gibel carp. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(6): 1130–1135 [王锐, 肖青, 桂建芳. 银鲫果糖-1,6-二磷酸酶的分子克隆与表达分析. *水生生物学报*, 2010, 34(6): 1130–1135]
- Wang XF, Liu QH, Wu Y, *et al.* cDNA cloning of coat-epsilon gene and its tissue distribution in *Fenneropenaeus chinensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(4): 147–152 [王修芳, 刘庆慧, 吴垠, 等. 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) coat-ε 基因全长 cDNA 克隆及组织分布. *渔业科学进展*, 2016, 37(4): 147–152]
- Wang YH, Yin XX, Ding MM, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of *Xbp1-S* of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(1): 73–82 [王玉红, 尹晓雪, 丁明媚, 等. 尼罗罗非鱼 *Xbp1-S* 基因克隆及表达分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(1): 73–82]
- Wang ZQ, Ren XY, Gao BQ, *et al.* cDNA cloning and expression analysis of *F-ATPase β* subunit gene in *Portunus trituberculatus* and its variation in family inbreeding. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(1): 97–106 [王竹青, 任宪云, 高保全, 等. 三疣梭子蟹 F 型 ATP 酶 β 亚基 (*F-ATPase β*) 基因的克隆、组织表达及在家系近交中的变化. *渔业科学进展*, 2018, 39(1): 97–106]
- Wu B, Yang AG, Sun XJ, *et al.* Effects of acute temperature stress on genome-wide DNA methylation profiles in *Patinopecten yessoensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 140–146 [吴彪, 杨爱国, 孙秀俊, 等. 急性温度胁迫对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*) 基因组 DNA 甲基化的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 140–146]
- Xiao HD, Chen CS, Xu Y, *et al.* Cloning and expression analysis of the chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase gene from *Pyropia haitanensis*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 33(4): 92–100
- Xu WT, Wang C, Xu XY, *et al.* Cloning and expression analysis of a novel gene encoding fructose-1,6-bisphosphatase in cotton. *Cotton Science*, 2013, 25(6): 549–556 [徐文亭, 王诚, 徐晓洋, 等. 一个棉花果糖-1,6-二磷酸酶基因的克隆与表达特征. *棉花学报*, 2013, 25(6): 549–556]
- York JD, Ponder JW, Majerus PW. Definition of a metal-dependent/Li(+)-inhibited phosphomonoesterase protein family based upon a conserved three-dimensional core structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(11): 5149–5153

(编辑 马瑾艳)



## cDNA Cloning of *FBP* Gene in *Pinctada fucata martensii* and Its Response to Temperature Stress

LAI Zhuoxin<sup>1</sup>, LIU Ya<sup>1</sup>, WANG Qingheng<sup>1,2①</sup>, ZHENG Zhe<sup>1,2</sup>, DENG Yuewen<sup>1,2</sup>

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088; 2. Pearl Breeding and Processing Engineering Technology Research Center of Guangdong Province, Zhanjiang 524088)

**Abstract** Fructose 1,6-bisphosphatase (FBP) is the rate-limiting enzyme in the gluconeogenesis process. When animals and plants are exposed to adverse environmental conditions, such as temperature stress, FBP participates in the gluconeogenesis pathway to maintain the body's sugar balance, playing an important role in animal and plant stress resistance. In this study, we obtained the *FBP* gene of the pearl oyster *Pinctada fucata martensii* (*Pm-FBP*) using the RACE technique and detected the expression level of this gene in six tissues of *P. fucata martensii* as well as its temporal expression pattern in the gill at 17°C (low-temperature group), 22°C (control group), and 32°C (high-temperature group). According to the results of sequence analysis, the full-length *Pm-FBP* sequence was 1381 bp long, including a 54 bp 5' UTR and a 62 bp 3' UTR. The open reading frame was 1020 bp long, encoding a peptide of 339 amino acids with a predicted molecular mass of 37.13 kDa. The isoelectric point of *Pm-FBP* was 6.02. *Pm-FBP* had a Pfam FBPase conserved domain, 6 potential O-linked glycosylation sites (Ser36, Ser56, Ser57, Ser76, Ser80, and Thr115), a potential N-glycosylation site, a metal-binding site (Asp-Pro-Ile/Leu-Asp-Gly/Ser-Thr/Ser), and 46 phosphorylation sites. Multiple sequence alignment showed that *Pm-FBP* had the highest homology with the corresponding gene in *Crassostrea gigas*, with a similarity value of 83%. The phylogenetic tree indicated that *Pm-FBP* was clustered with shellfish such as *C. gigas*, and then clustered with other mollusks, and arthropods and vertebrates were clustered together, and the evolutionary tree was clustered into three branches. Real-time fluorescence quantitative results showed that *Pm-FBP* was expressed in the adductor muscle, gill, gonads, hepatopancreas, foot, mantle, and other tissues. The gonads had the highest expression of *Pm-FBP*, followed by the hepatopancreas and gill. Time-series analysis showed that *Pm-FBP* expression first increased and then decreased, reaching the maximum at 72 h, which indicates that it may be involved in the response of *P. fucata martensii* to temperature stress. The *Pm-FBP* expression levels in the high-temperature and low-temperature groups decreased significantly at 120 h, suggesting that *Pm-FBP* may play an important role in short-term temperature stress. The results of this study provide reference data for further exploration of the adaptability of *P. fucata martensii* under temperature stress.

**Key words** *Pinctada fucata martensii*; *FBP*; Temperature stress; Expression analysis; Gene cloning

① Corresponding author: WANG Qingheng, E-mail: wangqingheng@163.com