

学校编码：10384 密级

学号：22420090153262

廈門大學

博士学位论文

福建牡蛎 (*Crassostrea angulata*) 幼体变态
相关基因及蛋白质组研究

Study on the genes and differentially expressed
proteins related to larval metamorphosis from Fujian oyster,
Crassostrea angulata

杨丙晔

指导教师姓名：柯才焕教授

专业名称：海洋生物学

论文提交日期：2013 年 5 月

论文答辩时间：2013 年 6 月

2013 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈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其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（）课题（组）的研究成果，获得（）课题（组）经费或实验室的资助，在（）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年月日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

() 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

() 2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人（签名）：

年月日

目录

摘要.....	1
Abstract.....	4
第一章绪论	8
1.1 我国贝类养殖现状	8
1.2 海洋无脊椎动物幼体附着变态的研究	9
1.3 双壳贝类幼体发育	11
1.4 生长发育相关基因	12
1.4.1 肾上腺素受体.....	12
1.4.2 蛋白激酶 C 和蛋白激酶 C 受体	12
1.4.3 胰岛素相关多肽受体.....	13
1.4.4 凋亡基因 Caspase	14
1.5 酵母双杂交系统	14
1.5.1 酵母双杂交系统的产生.....	15
1.5.2 酵母双杂交系统的原理.....	16
1.5.3 酵母双杂交系统的应用.....	17
1.5.4 酵母双杂交系统的优缺点.....	18
1.6 研究目的和意义	19
参考文献	20
第二章肾上腺素受体基因的克隆表达和功能分析.....	26
2.1 引言	26
2.2 材料与方法	28
2.2.1 实验材料.....	28
2.2.2 实验所用引物.....	28
2.2.3 总 RNA 的提取和 cDNA 第一条链的合成.....	29
2.2.4 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞的制备和质粒载体转染.....	29
2.2.5 肾上腺素受体 cDNA 全长的获得	30
2.2.6 肾上腺素受体 cDNA 序列和基因组序列分析	31

2.2.7 qRT-PCR 分析肾上腺素受体基因在不同组织和幼体发育阶段以及去甲肾上腺素诱导的表达情况.....	33
2.2.8 整体原位杂交的组织器官定位分析.....	34
2.3 结果	38
2.3.1 肾上腺素受体基因的序列和结构分析.....	38
2.3.2 肾上腺素受体基因在福建牡蛎不同组织中的表达.....	40
2.3.3 肾上腺素受体基因在福建牡蛎不同发育幼体的表达.....	41
2.3.4 去甲肾上腺素诱导福建牡蛎眼点幼体后肾上腺素受体基因的表达变化.....	42
2.3.5 肾上腺素受体基因在不同发育时期幼体的空间表达.....	42
2.4 讨论	44
2.5 结论	46
参考文献	47
第三章蛋白激酶 C 受体基因的克隆表达分析及与蛋白激酶 C 信号通路的功能分析	51
3.1 引言	51
3.2 材料与方法	53
3.2.1 实验材料.....	53
3.2.2 实验所用引物.....	53
3.2.3 总 RNA 的提取和 cDNA 第一条链的合成.....	53
3.2.4 蛋白激酶 C 受体 cDNA 全长和基因组序列的获得	53
3.2.5 蛋白激酶 C 受体 cDNA 序列和基因组序列分析	54
3.2.6 qRT-PCR 分析时空表达和诱导表达	54
3.2.7 蛋白激酶 C 抑制剂对去甲肾上腺素诱导幼体变态的影响。	54
3.3 结果	55
3.3.1 蛋白激酶 C 受体基因的序列和结构分析.....	55
3.3.2 蛋白激酶 C 受体基因在福建牡蛎不同组织的表达情况.....	59
3.3.3 蛋白激酶 C 受体基因在福建牡蛎幼体不同发育时期的表达情况.....	59
3.3.4 蛋白激酶 C 受体和蛋白激酶 C 基因被去甲肾上腺素诱导后的表达	

分析.....	60
3.3.5 蛋白激酶 C 抑制剂对去甲肾上腺素诱导效果的影响.....	61
3.4 讨论	63
3.5 结论	65
参考文献	66
第四章福建牡蛎幼体变态过程中凋亡基因 Caspase 的序列和功能分	
析.....	70
4.1 引言	70
4.2 材料与方法	72
4.2.1 实验材料.....	72
4.2.2 实验所用引物.....	72
4.2.3 实验方法.....	73
4.3 结果	76
4.3.1 Ca-Caspase2 和 Ca-Caspase3 基因的序列和结构分析.....	76
4.3.2 Ca-Caspase2 和 Ca-Caspase3 蛋白序列比对和进化树分析.....	78
4.3.3 Ca-Caspase2 和 Ca-Caspase3 在变态幼体中的功能定位分析.....	82
4.4 讨论	84
4.5 结论	86
参考文献	87
第五章与胰岛素相关多肽受体相互作用蛋白的基因 IRRBP 表达和功	
能分析	91
第一节与胰岛素相关多肽受体 (IRR) 相互作用蛋白的基因筛选 ..	91
5.1.1 引言	91
5.1.2 材料与方法	93
5.1.2.1 实验材料.....	93
5.1.2.2 实验方法.....	97
5.1.3 结果	103
5.1.3.1 pGBKT7-IRR 诱饵质粒的构建和鉴定.....	103

5.1.3.2 pGBKT7-IRR 诱饵质粒对 AH109 的毒性作用	104
5.1.3.3 pGBKT7-IRR 诱饵质粒转化酵母株 AH109 的筛选鉴定	104
5.1.3.4 pGBKT7-IRR 诱饵质粒自激活实验检测	106
5.1.3.5 lacZ 报告基因的表达实验检测	107
5.1.3.6 pGADT7-Rec 接头质粒的构建和鉴定	108
5.1.3.7 福建牡蛎幼体 cDNA 文库的构建	110
5.1.3.8 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 四缺平板培养基阳性克隆的筛选和序列的 获得	111
5.1.4 讨论	116
5.1.5 结论	117
第二节 IRRBP 基因的序列表达和功能分析	118
5.2.1 引言	118
5.2.2 材料与方法	119
5.2.2.1 实验材料	119
5.2.2.2 实验方法	119
5.2.3 结果	125
5.2.3.1 IRRBP 基因不同幼体发育时期的表达分析	125
5.2.3.2 IRRBP 基因组织特异性表达分析	126
5.2.3.3 IRRBP 基因在鳃组织中的原位表达分析	127
5.2.3.4 IRRBP 基因在外套膜组织中的原位表达分析	127
5.2.3.5 IRRBP 基因在幼体不同发育阶段的器官定位研究	128
5.2.4 讨论	131
5.2.5 结论	132
参考文献	133
第六章福建牡蛎附着变态过程中的差异蛋白质组研究	136
6.1 引言	136
6.2 材料与方法	138
6.2.1 实验样品	138
6.2.2 主要试剂	138

6.2.3 主要仪器.....	138
6.2.4 主要溶液的配制.....	139
6.2.5 幼体总蛋白和 RNA 的提取及 cDNA 第一条链的合成.....	141
6.2.6 蛋白浓度测定.....	141
6.2.7 双向电泳.....	142
6.2.8 染色.....	143
6.2.9 差异蛋白酶解及质谱鉴定.....	143
6.3 结果	145
6.3.1 蛋白差异点的筛选和鉴定.....	145
6.3.2 蛋白差异点 mRNA 水平的表达验证	147
6.4 讨论	150
6.5 结论	152
参考文献	153
第七章结论与创新点	157
缩略语表	159
发表论文	160
致谢.....	161

Tables of Contents

Abstract (in Chinese)1

Abstract (in English)4

Chapter 1 Introduction8

1.1 The status of Shellfish farming8

1.2 The studies of the larval settlement and metamorphosis in marine invertebrate9

1.3 The larval development in bivalve..... 11

1.4 The genes on the larval development 12

 1.4.1 Adrenergic receptor 12

 1.4.2 Protein kinase and the receptor of protein kinase C 12

 1.4.3 Insulin-related peptides receptor 13

 1.4.4 The Caspase gene in apoptosis 14

1.5 The yeast two-hybrid system 14

 1.5.1 The origin of the yeast two-hybrid system 15

 1.5.2 The theory of the yeast two-hybrid system 16

 1.5.3 The application of the yeast two-hybrid system 17

 1.5.4 The merit and demerit of the yeast two-hybrid system 18

1.6 Aims and significance 19

References 20

Chapter 2 Characterization and functional analysis of adrenergic like receptor during larval metamorphosis in *Crassostrea angulata*26

2.1 Introduction.....26

2.2 Materials and methods28

 2.2.1 The samplings28

 2.2.2 The primers sequences28

 2.2.3 Isolation of the total RNA and the first stranded synthesis29

 2.2.4 Preparation of the DH5 α competent cells and the plasmid transfection

.....	29
2.2.5 The full cDNA sequence of adrenergic receptor	30
2.2.6 The sequence analysis of adrenergic receptor	31
2.2.7 The expression analysis in different tissues and in the larvae during different development stages and after EPI treatment	33
2.2.8 The location analysis by the whole mount in situ hybridization	34
2.3 Results	38
2.2.1 The sequence and structure analysis of adrenergic receptor	38
2.2.2 The expression analysis in different tissues	40
2.2.3 The expression analysis in the larvae during different development stages	41
2.2.4 The expression analysis in the larvae after EPI treatment	42
2.2.5 The spacial expression in different development stages	42
2.4 Discussion	44
2.5 Conclusions	46
References	47
Chapter 3 Characterization of Receptor of activated C kinase 1(RACK1) and Involvement of PKC/RACK1 signal pathway during Larval Metamorphosis of <i>Crassostrea angulata</i>	51
3.1 Introduction	53
3.2 Materials and methods	53
3.2.1 The samplings	53
3.2.2 The primers sequence	53
3.2.3 Isolation of the total RNA and the first stranded synthesis	53
3.2.4 The full cDNA and genomic sequence of RACK	53
3.2.5 The sequence analysis	54
3.2.6 The expression analysis in different tissues and in the larvae during different development stages and after EPI treatment	54
3.2.7 The treatment with PKC inhibitor and EPI	54

3.3 Results	55
3.3.1 The sequence and structure analysis of RACK.....	55
3.3.2 The RACK expression analysis in different tissues.....	59
3.3.3 The RACK expression analysis in the larvae during different development stages	59
3.3.4 The RACK and PKC expression analysis in the larvae after EPI treatment	60
3.3.5 The treatment with PKC inhibitor and EPI.....	62
3.4 Discussion	63
3.5 Conclusions	65
References	65
Chapter 4 Characterization and function analysis of Caspase genes	70
4.1 Introduction	70
4.2 Materials and methods	72
4.2.1 The samplings	72
4.2.2 The primers sequence	72
4.2.2 The methods.....	73
4.3 Results	76
4.3.1 The sequence and structure analysis of Ca-Caspase2 和 Ca-Caspase3	76
4.3.2 The multiple comparison of Ca-Caspase2, Ca-Caspase3 and other Caspase proteins.....	78
4.3.3 The spacial expression of the Ca-Caspase2 和 Ca-Caspase3 in different development stages	83
4.4 Discussion	84
4.5 Conclusions	86
References	87
Chapter 5 The selection of proteins interacted with IRR and the expression pattern and function analysis of IRRBP	91

Part 1	The selection of proteins interacted with IRR.....	91
5.1.1	Introduction.....	91
5.1.2	Materials and methods	93
5.1.2.1	The materials.....	93
5.1.2.2	The methods.....	97
5.1.3	Results	103
5.1.3.1	The construction of pGBKT7-IRRplasmid.....	103
5.1.3.2	The growth effecton of AH109 transfected withpGBKT7-IRR	104
5.1.3.3	The selection of AH109 transfected with pGBKT7-IRR.....	105
5.1.3.4	The detection of self-activation of pGBKT7-IRR	106
5.1.3.5	The detection of lacZ expression	107
5.1.3.6	The construction of pGADT7-Rec plasmid.....	108
5.1.3.7	The construction of the larval cDNA library	110
5.1.3.8	The selection of the yeast strains by SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp medium	111
5.1.4	Discussion	116
5.1.5	Conclusions.....	117
Part 2	The expresion pattern and function analysis of IRRBP.....	118
5.2.1	Introduction.....	118
5.2.2	Materials and methods	119
5.2.2.1	The materials.....	120
5.2.2.2	The methods.....	120
5.2.3	Results	125
5.2.3.1	The IRRBP expression analysis in the larvae during different development stages	125
5.2.3.2	The IRRBP expression analysis in different tissues	123
5.2.3.3	The IRRBP location in gills by in situ hybridizaiont.....	124
5.2.3.4	The IRRBP location in mantle by in situ hybridizaiont.....	125
5.2.3.5	The IRRBP location in the larvae during different development stages	

.....	129
5.2.4 Discussion	131
5.2.5 Conclusions.....	132
References.....	133
Chapter 6 Identification of differentially expressed proteins involved in the larvae before settlement and during the larval metamorphosis from the oyster <i>Crassostrea angulata</i>	136
6.1 Introduction.....	136
6.2 Materials and methods	138
6.2.1 The samplings	138
6.2.2 The reagents	138
6.2.3 The instruments.....	138
6.2.4 The preparation of the solutions	139
6.2.5 The extract of the whole protein and RNA and the first stranded synthesis.....	141
6.2.6 Protein concentration	141
6.2.7 2D-PAGE	142
6.2.8 Dyeing.....	143
6.2.9 Differential proteins identification.....	143
6.3 Results	144
6.3.1 The selection and identification of differential proteins	144
6.3.2 The mRNA expression by qRT-PCR.....	147
6.4 Discussion.....	149
6.5 Conclusions.....	151
References.....	152
Chapter 7 Conclusions and prospects.....	157
Abbreviation.....	159
Publications	错误！未定义书签。

Acknowledgements 错误！未定义书签。

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

附着和变态是海洋无脊椎动物幼体生活史中关键的环节之一，变态的成功与否与种群动态密切相关。这一过程涉及到行为和形态学上激烈的变化，也涉及复杂的分子生物学过程。福建牡蛎（*Crassostrea angulata*）又称葡萄牙牡蛎，是我国东南沿岸重要的主导养殖贝类之一。本文采用分子生物学方法，研究福建牡蛎幼体附着和变态过程中相关功能基因的作用，探讨幼体附着和变态的分子机制，期望为贝类早期发育生物学和分子生态学提供新资料，也为牡蛎人工育苗技术改进提供理论基础。

本研究从福建牡蛎幼体转录组文库中获得了肾上腺素受体基因的 EST 片段序列，利用末端快速扩增技术（RACE）首次从福建牡蛎幼体获得肾上腺素受体基因 cDNA 序列，全长 1833bp。蛋白序列与肩突硬蜱的 α 型肾上腺素受体关系最近，氨基酸序列包含七次跨膜结构域，这是 G 蛋白耦联受体标志性的特征。还含有一个相对较长的第三细胞内结构域和一个较短的第四尾部结构域，这也是 α 型肾上腺素受体的特征。荧光定量 PCR 技术检测发现肾上腺素受体在福建牡蛎成体各组织都有分布，其中在外套膜和唇瓣组织表达量相对较高。同时还检测了肾上腺素受体在福建牡蛎幼体不同发育时期的表达情况，发现随着幼体的发育肾上腺素受体基因的表达不断升高，在附着变态前表达最高，随后开始逐渐下降。通过整体原位杂交实验发现肾上腺素受体主要定位在牡蛎幼体的顶点神经节周围，在幼体足和心脏的部位也有相对集中的分布。肾上腺素诱导实验发现，肾上腺素受体的表达受肾上腺素诱导调节。

同样利用 RACE 技术获得了蛋白激酶 C 受体(RACK)基因序列，全长 1148bp，编码 317 氨基酸。从福建牡蛎幼体获得 RACK 基因编码的蛋白序列不仅与软体类有很高的相似性，与鱼类、两栖类甚至是哺乳类都有非常高的相似度，说明了 RACK 基因在历史进化过程中具有高度的保守性。利用 cDNA 序列设计引物，PCR 获得了 RACK 基因的基因组序列，发现 RACK 基因组有 7 个外显子和 6 个内含子。对不同组织和发育时期的幼体检测，发现 RACK 在不同组织中都有分布，无组织特异性，但在不同发育时期的幼体中 RACK 基因会在变态过程中大量表达，说明了此基因与幼体的变态有着密切关联。通过去甲肾上腺素诱导实验

发现 RACK 基因和蛋白激酶 C 基因都会表达明显上调,说明了 PKC/RACK 信号通路在福建牡蛎幼体附着变态过程中起了重要的作用。

利用 RACE 克隆获得了两个凋亡基因 Ca-Caspase2 和 Ca-Caspase3, Ca-caspase2 序列全长 2528bp, 开放阅读框为 1923bp, 编码 641 个氨基酸。软件推测蛋白序列的分子量为 72.1kD, 等电点为 6.66。Ca-Caspase2 属于凋亡起始基因,在 Caspase 主导的细胞凋亡信号通路中处于起始位置,负责凋亡信号的传导。Ca-Caspase3 序列全长 1381bp, 开放阅读框为 1215bp, 编码 404 个氨基酸。软件推测蛋白序列的分子量为 46.1kD, 等电点为 5.4。Ca-caspase2 和 Ca-caspase3 基因都含有 P10 和 P20 大小亚基结构域,且含有保守的丝氨酸活性中心序列“QACRG”和组氨酸活性标签。Ca-Caspase3 属于凋亡执行基因,处于细胞凋亡信号通路中末端,参与细胞凋亡的生理过程。利用整体原位杂交技术,将 Ca-Caspase2 和 Ca-Caspase3 基因表达定位在牡蛎幼体变态时期的面盘和足上, Ca-Caspase2 可能介导了牡蛎幼体足部细胞凋亡的信号传导和蛋白激活,而 Ca-Caspase3 在幼体足部和面盘的消亡方面都起作用。

成功构建了带有胰岛素相关多肽受体基因的 pGBKT7-IRR 诱饵质粒和福建牡蛎幼体带有接头序列的 cDNA 文库,然后与带有接头序列的 pGADT7-Rec 共转染酵母菌株 AH109,通过在营养缺陷酵母培养基上生长,筛选获得与胰岛素相关多肽受体有相互作用的基因 IRRBP。通过比对搜索发现只有在太平洋牡蛎中发现 IRRBP 基因的同源序列,所以就目前来看 IRRBP 应该是牡蛎特有的一种基因。IRRBP 基因在福建牡蛎幼体变态时期表达显著升高。在成体不同组织表达检测发现,外套膜和鳃组织表达量明显高于其它各组织,利用组织切片原位杂交发现 IRRBP 基因主要表达在外套膜和鳃组织的表皮细胞中。以上结果表明 IRRBP 基因对外套膜和鳃组织的生长具有重要作用,推测 IRRBP 可能是牡蛎特有的一种与生长密切相关的结合因子。

利用双向电泳技术对福建牡蛎幼体附着变态前和附着变态过程中蛋白质组进行差异表达分析。经质谱鉴定出来 39 种蛋白表达差异,并对 39 种差异蛋白进行了功能分类,利用荧光定量 PCR 技术验证了其中 10 个蛋白点的基因表达情况。发现有 9 个蛋白质点的 mRNA 表达水平和蛋白表达水平是一致的,有一个是相反的。发现的差异蛋白质点中有几个酶蛋白都是关于营养物质消耗的,如乙酰辅

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.

廈門大學博碩士論文摘要庫