

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17101

曼氏无针乌贼 *Phb2* 基因的克隆和其在不同生长阶段的表达分析

毋玉婷¹, 郭宝英¹, 祁鹏志¹, 吕振明¹, 吴常文¹, 史会来², 平洪领²

1. 浙江海洋大学 国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022;

2. 浙江省海水养殖重点实验室 浙江省海洋水产研究所, 浙江 舟山 316022

摘要: *Phb2* 是抗增殖蛋白(Prohibitin)的一个亚型。本研究利用 RACE 技术首次获得了曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*) *Phb2* 基因的全长序列, 该序列全长为 1283 bp, 其中 5'非编码区(5'-UTR)150 bp, 3'非编码区(3'-UTR)236 bp, 开放阅读框(ORF)897 bp, 预测编码 298 个氨基酸。序列分析表明, 曼氏无针乌贼 *Phb2* 基因编码的蛋白无信号肽, 第 20~42 位氨基酸为跨膜结构, 包含 1 个 PHB 家族的结构域。采用荧光定量 PCR 技术检测其在曼氏无针乌贼不同生长时期(幼体、产卵前、产卵中、产卵后濒死前)各组织中的表达情况, 结果显示, *Phb2* 在 4 个时期的各组织中均有表达, 其中, 幼体和濒死前表达量较低, 产卵前和产卵中的表达量则相对较高, 在各时期中脑、肝表达较多。视腺作为与生殖调控有关的内分泌器官, 其 *Phb2* 基因表达具有时期差异性, 在产卵后的表达量由产卵时期的高表达大幅下降, 说明 *Phb2* 具有周期调节、控制细胞衰老和凋亡的多效性功能。本研究结果可为进一步了解抗增殖蛋白对曼氏无针乌贼的抗衰老作用提供参考。

关键词: 抗增殖蛋白 *Phb2*; 表达分析; 曼氏无针乌贼; 抗衰老

中图分类号: S917; Q96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)01-0009-09

曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*, de Roche-brune), 隶属软体动物门(Mollusca), 头足纲(Cephalopoda), 十腕目(Decapoda), 乌贼科(Sepiidae), 无针乌贼属, 在中国沿海分布较广, 具有很高的食用、药用及经济价值。曼氏无针乌贼属一年生、一次生殖型, 产卵后即死亡, 这也是中、小型头足类的共同特征^[1]。衰老和死亡是十分复杂的生物学现象, 有研究者从细胞水平和分子水平进行衰老机理的探讨^[2]。有关动物的衰老相关蛋白基因的研究很多, 无脊椎动物由于其取材方便, 易于在实验室内饲养繁殖, 生殖周期短, 寿命短, 以及在用于衰老研究时容易进行实验操作、实验周期短等特点, 常被选作衰老相关研究的实验材料。衰老并不是一个静态的细胞终点, 它是广泛存在于从酵母到哺乳动物的真核修复和癌症以及

衰老过程相关的一系列动态细胞状态。作为重要的头足类经济种, 曼氏无针乌贼究竟为何产卵后便会死亡? 具体相关的衰老机制如何? 至今均未见有相关研究。

抗增殖蛋白(Prohibitin)是一种高度保守的蛋白, 广泛存在于从酵母到哺乳动物的真核生物中, 在细胞周期管理、分化、老化以及抗增殖活动中扮演重要角色^[3-6]。*Phb* 基因家族包括 *phb1* 和 *phb2* 两种亚型。*Phb* 的亚细胞定位主要位于细胞的线粒体内膜、细胞核和细胞膜, 可以通过调节细胞增殖、凋亡与分化和调控激素及其受体活性而发挥抗肿瘤作用。*Phb2* 作为 Prohibitin 家族的一个亚型, 对于真核生物中的细胞存活是必需的^[7]。有研究发现, *Phb2* 通过与 E2F、pRb 和 p53 的相互作用在调节细胞周期进程中起关键作用^[8], 作为

收稿日期: 2017-03-16; 修订日期: 2017-03-27.

基金项目: 科技部国际科技合作港澳台项目(2014DFT30120); 农业部渔业渔政管理局物种资源保护项目(17162130135252089); 舟山市科技局项目(2013C41001); 浙江海洋大学“海洋科学”省重中之重学科开放课题(20160109); 浙江省科技计划项目(2015F50055)

作者简介: 毋玉婷(1992-), 硕士研究生, 研究方向为海洋分子生物学. E-mail: wyting0507@163.com

通信作者: 郭宝英, 副教授. E-mail: guobaoying@zjou.edu.cn

分子伴侣角色参与能量代谢并发挥抗衰老作用,参与 T、B 淋巴细胞的信号转导及与补体 C3 的结合来调节机体的免疫应答^[9],它的缺失或表达异常会造成细胞的功能障碍甚至病理变化。

本研究在转录组测序数据基础上利用 RACE 技术,首次成功获得了曼氏无针乌贼抗增殖蛋白 *Phb2* 基因全序列,利用荧光定量 PCR 技术分析了在曼氏无针乌贼不同生长阶段表达的差异,为进一步研究抗增殖蛋白 *Phb2* 的功能,探究与乌贼衰老之间的关系奠定了基础,同时对于曼氏无针乌贼人工增殖产业的发展以及资源的恢复均具有重要的指导意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用曼氏无针乌贼于 2016 年 8 月取自福建省福鼎市沙埕镇曼氏无针乌贼苗种繁育和养成示范基地。随机选取健康乌贼,分别取 4 个不同生长阶段(幼体、产卵前、产卵中、产卵后濒死期)的样品。根据养殖时间,通过形态观察及解剖观测^[19]区分乌贼处于何种生长阶段。每个阶段各取 4 头健康活乌贼,迅速解剖,分别取出各组织(肠、心脏、胃、胰腺、肝脏、鳃、皮肤、肌肉、脑、视叶、视腺共 11 种),每两头乌贼的同一组织放入含有 RNA 保存液的冻存管中,迅速置于液氮中速冻保存运回实验室备用。

实验试剂 Trizol、荧光定量 PCR 试剂 SYBR[®] Premix ExTaq[™]、pMD18-T Vector、*E. coli*DH5 均购自大连宝生物工程有限公司;Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒购自 Roche 公司;SMARTer[™]RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司;5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Version2.0 购自 Gibco BRL 公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的反转录

用 Trizol 法提取总 RNA。取无菌离心管并做好标记,每个离心管取 50~100 mg 的组织,依次放入研磨器中,加入 1 mL Trizol 充分匀浆,室温静置 5 min。加入 200 μ L 氯仿,4℃、12000 r/min,离心 15 min。吸取上清液,加入异丙醇上下颠倒

混匀,置于冰上,静置 10 min。4℃,12000 r/min,离心 10 min。弃去上清,加入 1 mL 的 75%乙醇洗涤。4℃、7500 r/min,离心 10 min,保留沉淀,室温下干燥 5 min,加入 25 μ L DEPC 水溶解。用紫外分光光度计和 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度和完整度。将提取后的 RNA 在-80℃超低温冰箱中保存备用。之后使用 Roche 公司的反转录试剂盒 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 将提取的 RNA 反转录为 cDNA,操作方法按试剂盒说明书进行。

1.3 曼氏无针乌贼 *Phb2* 基因 cDNA 全长的获得

根据本实验室获得的曼氏无针乌贼转录组测序及注释信息(未发表),初步获得抗增殖蛋白 2(prohibitin2, *Phb2*)基因的部分 cDNA 片段,在 NCBI 上进行 Blast 并设计引物 F1、R1(表 1),以上述获得的曼氏无针乌贼肝的 cDNA 为模板,用 *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,之后对目的片段进行回收纯化、测序。测序结果经比对与转录组数据相同,即作为后续 RACE 步骤的核心片段。采用 RACE 技术,设计引物扩增基因的 5'端和 3'端,所用引物见表 1。

表 1 引物序列	
Tab. 1 Sequences of the primers	
名称 name	序列(5'-3') sequence (5'-3')
F1	ATGGACCCCCAAAAATTAGG
R1	CTTCTTAATATGCTCTGCAG
GSP-1	CCCTGAAATGGATACC
GSP-2	CCGATTTCACACCACCAA
GSP-3	CCCTGTGTCCACCCTCAA
C058-1	CCGAAGCTGCAAAGATGGTTGGAC
C058-2	TCAGAGCTGCTCAATCCATTTC
<i>Phb2</i> F	CCAGCGTCAGCAGGTCAGT
<i>Phb2</i> R	GCTTCAACGGCAGCAGTGTA
β -actinF	GCCAGTTGCTCGTTACAG
β -actin R	GCCAACAATAGATGGGAAT

3'RACE: 使用逆转录酶 SMARTScribe[™] Reverse Transcriptase 和引物 3' CDS primer A 对总 RNA 进行逆转录合成 cDNA;使用引物 C058-1 和 UPM,以合成的 cDNA 为模板进行第一轮 PCR 扩增;将第一轮 PCR 扩增产物稀释 50 倍后用引物 C058-2 和 UPM 进行第二轮 PCR 扩增;将第二轮 PCR 产物进行电泳并对目的条带进行切胶回收纯

化。5' RACE: 使用 SUPERScript II RT 酶和引物 GSP-1 对总 RNA 进行目的基因第一链 cDNA 的合成, 使用 RNase Mix 对合成的 cDNA 进行去 RNA 处理; 使用 DNA 纯化系统 GLASSMAX DNA isolation spin cartridges 对经 RNAase 处理过的 cDNA 进行纯化; 使用 TdT 酶和 dCTP 对纯化后的 cDNA 进行末端加上多聚 C; 使用引物 GSP-2 和试剂盒里面的桥连铆钉引物 AAP 对已经加 dC 尾的 cDNA 进行 PCR 第一轮扩增; 使用引物 GSP-3 和试剂盒里面带的桥连通用扩增引物 AUAP 进行巢式 PCR 第二轮扩增; 将获得的 PCR 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 对目的条带切胶回收, 克隆到 pMD18-T 载体上 (TaKaRa), 然后转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α , 挑取阳性克隆送测序, 得到有效目的片段序列并拼接。

1.4 生物信息学分析

在 NCBI 的 Blastp 中 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastx>) 进行同源性比对; 在 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 上推测开放阅读框及其编码的氨基酸序列; 利用 Ex Pasy 中的 ProtParam tool 进行氨基酸序列的物理参数分析及预测; 使用 Signal P 4.1 server 预测信号肽; 使用 Target P 1.1 server 进行导肽的预测; 使用 TMHMM 在线软件进行跨膜结构的分析; 利用 SMART 数据库分析结构域; 利用 ClustalX 进行多序列比对; 利用 MEGA 6.0 软件中的邻位相接法 (NJ) 构建曼氏无针乌贼 *phb2* 氨基酸序列与其他物种的氨基酸序列的系统进化树, 采用 Bootstrap 重复 1000 次计算各分支的置信度。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测

根据获得的曼氏无针乌贼 *Phb2* 基因的全长, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计并合成荧光定量引物 *Phb2*-F、*Phb2*-R 及内参引物 β -actin (表 1)。分别取 4 个不同生长阶段的乌贼样品。以反转录各组织的 cDNA 为模板, β -actin 为管家基因, 通过荧光定量 PCR 仪器 ABI-7500 型收集各组织的 *phb2* 基因表达水平数据, 按照 TaKaRa 的荧光定量 PCR 试剂的方法, 以每管 10 μ L 的体系配制反应液: 分别加入 5 μ L 的 2 $\times$ SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II, 0.2 μ L 的 ROX Reference Dye II, 各 0.4 μ L

的正反向引物 (10 μ mol/L) 和 cDNA, 3.6 μ L 的 DEPC H₂O。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s。为保证实验结果的准确性, 加样时每个样品及内参均设置 3 个重复, 并判断反应特异性。根据扩增曲线得到 C_T 值, 即荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。之后用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对结果进行分析, 计算各个基因的相对表达量, 通过 Origin 8.1 软件对数据进行处理并导出柱状图。

1.6 统计分析

数据处理和柱状图的绘制使用 Origin 8.1 软件, 统计分析采用 SPSS 17.0 软件, 差异显著水平检验采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 同一字母之间为差异不显著 ($P > 0.05$), 不同字母之间为差异显著 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

将测序结果拼接获得完整的曼氏无针乌贼 *phb2* 基因, 全长 1283 bp, GenBank 数据库登录号为 APX42718.1, 其中 5' 非编码区 (5'-UTR) 150 bp, 3' 非编码区 (3'-UTR) 236 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 897 bp (图 1), 编码一个由 298 个氨基酸组成的蛋白质。ProtParam tool 分析表明, 分子量为 33.04 kD, 理论等电点为 9.76, 带有负电的氨基酸残基为 29 个 (Asp 和 Glu), 带有正电的氨基酸残基为 42 个 (Arg 和 Lys), 不稳定系数为 40.80, 亲水性平均数为 -0.193, 脂溶指数为 98.56, A+T 含量 (55.81%) 高于 G+C 含量 (44.18%)。

采用 Signal P 4.1 Server 预测蛋白质序列中的信号肽的剪切位点, 结果显示, 曼氏无针乌贼 *phb2* 基因编码的蛋白不含有信号肽; 通过 Target P 1.1 server 进行导肽查找, 结果显示, 线粒体目标肽及分泌途径信号肽分别为 0.096 (mTP) 和 0.088 (SP), 预测可靠性为 2, 说明该蛋白不存在信号肽酶切位点, 无线粒体目标肽, 无信号肽, 因此推测 *phb2* 无信号肽, 属于非分泌型蛋白。使用 TMHMM 在线软件分析, *phb2* 基因翻译的蛋白质结构中有 1 个跨膜结构, 位于第 20~42 位氨基酸 (图 2)。利用 SMART 数据库对结构域检测分析

```

1  GGCCACGCGTCTAGTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGTACGTGTT
51  AGGCATCCATTACAGATTCTAATTTCTTTGGGGGCTTAGAAGAAGTTA
101  AGAAAAATAAATCCAGATCTTCTGTTGAATTGCAAAACCAACTATAA
152  ATGACCCCAAAAAATTAGGAGACCTGGCTAATAGGCTTCGAGGCGGCAGT
1  M D P K K L G D L A N R L R G G S
201  AAAGGTTTAGGAGCCGGTGTGGCCCTTTTAGCAATGGCAGGAGGCTTGGCT
18  K G L G A G V G L L A M A G G L A
254  TATGGAATATCCCAATCTATCTACACAGTTGAGGGTGGACACAGGCTATT
35  Y G I S Q S I Y T V E G G H R A I
305  ATCTTCAGCAGAATTGGTGTGAAATCGGATATTTATGCTGAAGGTATC
52  I F S R I G G V K S D I Y A E G I
356  CATTTACAGGTTCCCTGGTTCATTACCGATCATTTATGATATTCGTTCA
69  H F R V P W F H Y P I I Y D I R S
407  AAGCGAGAAAATTATCTTCCCAAGCAAGCAAGATTTCAGAAATGGTG
86  K P R K L S S P T G S K D L Q M V
458  AACATCACACTTCGTGTTTGTGACGGCCAGATGCTTTTCTCTCTATC
103  N I T L R V L S R P D A F S L P I
509  ATGTACCGCAACTAGGTTTGGATATGATGAACGTGCTTACCATCCATT
120  M Y R Q L G L D Y D E R V L P S I
560  TGTAATGAGGTTTTAAAAAGTGTGTGCTAAATTCAGCTCTCAGTTA
137  C N E V L K S V V A K F N A S Q L
611  ATAACCCAGGTCAGCAGGTGATGTTAATACGAGGCAAGTGGCTGAC
154  I T Q R Q Q V S M L I R R Q L L D
662  CGGGCCAAAGATTTCACATATCCCTTGATGATGATCAATCACAGACCTC
171  R A K D F H I I L D D V S I T D I
713  AGCTTTGGACGGAGTACACTGCTGCGTGAAGCCAAACAGGTTGCCAG
188  S F G R E Y T A A V E A K Q V A Q
764  CAAGAAGCTCAGCGTCCCGAGTTGTTGTAGAAAAGGCCAAGCAGGAACGA
205  Q E A Q R A Q F V V E K A K Q E R
815  CAACAGAAGATTGTACAAGCCGAAGGAGAAGCCGAGCTGCAAAAGATGTT
222  Q Q K I V Q A E G E A E A A K M V
855  GGACAGGCTATTTCTACCAATCCAGGCTATCTGAACCTAAGAAAGATCAGA
239  G Q A I S T N P G Y L K L R K I R
917  GCTGCTCAATCCATTTCCAAAACAAATGCTGCTCCCAAAATAGAGTCTTC
256  A A Q S I S K T I A A S Q N R V F
968  TTGGATTCCAAATTCCTTGACGCTGAATATAATGGATCCCTTGTGTTGGTAA
273  L D S N S L T L N I M D P L F G E
1019  TCTGCAGACATATTAAGAAGAAAATTAGATTGTCACCTGTATGTGTTT
290  S A E H I K K K I *
1070  TAGAATGATTGGAAAGGAAGAGTGGTCCCTCTCTCTGCTGTGGCGCT
1121  GACTACTGCAACATCTTTGGACGCTTTTAGTCCCTATTCATCTTCGCAA
1172  AAAAAAACCAAAATGTGAAGGTGAACATACATATTAATCAAAATTA
1223  AATGATAAATAAATTCAAATATCAATGAAAAAATAAAAAAAAAAAAA
1234  AAAAAAAAAA

```

图 1 曼氏无针乌贼 *phb2* 基因全长 cDNA 及推导的氨基酸序列

红色字为起始密码子与终止密码子；下划线部分为跨膜区；灰色阴影为 PHB 家族结构域；黄色阴影为 PolyA 的加尾信号序列。

Fig. 1 Full-length *Phb2* cDNA of *Sepiella japonica* and the deduced amino acid sequence

The red words are the start codon and the stop codon. The transmembrane region is underlined. Gray shadows are PHB family domains. The yellow shade is PolyA's tail signal sequence.

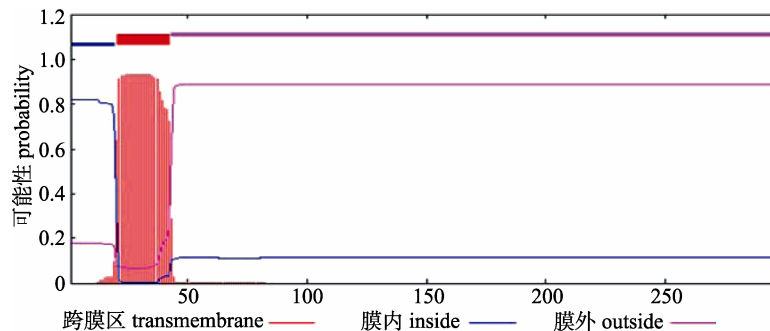


图 2 曼氏无针乌贼 *Phb2* 蛋白跨膜结构

Fig. 2 Transmembrane structure of *Phb2* protein in *Sepiella japonica*

显示(图 3), *phb2* 包含 1 个 PHB 结构域。

2.2 曼氏无针乌贼 *phb2* 基因的同源性分析

将曼氏无针乌贼 *Phb2* 基因编码的氨基酸序列与 GenBank 蛋白数据库作 Blast 比对进行同源性分析(图 4), 发现与加州双斑蛸(*Octopus bimaculoides*) 同源性最高, 为 87%; 与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、栉孔扇贝(*Azumapecten farreri*)、加州海兔(*Aplysia californica*)、苜蓿切叶蜂(*Megachile rotundata*)、墨西哥脂鲤(*Astyanax mexicanus*)、卷尾猴(*Cebus capucinus imitator*)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、鹿角珊瑚(*Acropora digitifera*)、水蛭(*Hydra vulgaris*)的相似性分别为 74%、79%、73%、76%、71%、72%、72%、75%、71%。

基于 *Phb2* 基因的氨基酸序列, 利用 MEGA6 软件以 NJ 法构建了系统进化树(图 5)。可以看出, 曼氏无针乌贼与加州双斑蛸亲缘关系最近, 它们同属于软体动物门头足纲, 最先聚为一支, 然后与节肢动物门膜翅目的苜蓿切叶蜂聚在一起, 再与软体动物门双壳纲的长牡蛎、栉孔扇贝、腹足纲的加州海兔聚在一起, 接着与脊索动物聚为一支, 而与鹿角珊瑚、水蛭的亲缘关系则相对较远。这显示曼氏无针乌贼 *Phb2* 基因的分子进化地位与其生物学分类地位大体保持一致。

2.3 曼氏无针乌贼 *Phb2* 基因的表达

应用荧光定量 PCR 技术分析 *Phb2* 基因在曼氏无针乌贼 4 个生长阶段中的表达情况, 结果显示(图 6), *Phb2* 基因在这 4 个生长阶段均有表达, 从幼乌贼到性成熟产卵前, 再到产卵中, 基因表达量逐渐增加, 呈上升趋势, 产卵中表达量达到最高, 而后到死亡前表达量又有所下降。产卵前、产卵中表达量与幼体、濒死前相比差异显著

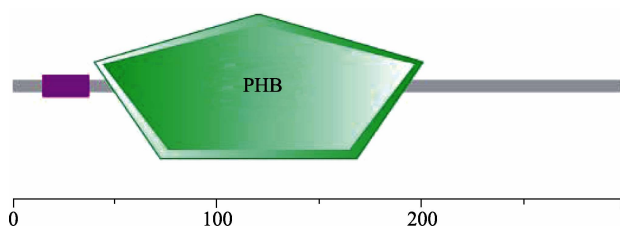


图 3 曼氏无针乌贼 *Phb2* 蛋白结构域

标尺长度为 *Phb2* 蛋白的氨基酸长度。

Fig. 3 Protein domain of *Phb2* protein in *Sepiella japonica*
The length of the scale is the amino acid length of the *Phb2* protein.

($P < 0.05$)。在各组织中也均有表达(图 7), 其中, 肌肉、鳃、胰腺和肝脏中的表达总量较高, 表达量最高是鳃(产卵中, 2.037)中, 其他组织间无显著差异; 与幼乌贼时期相比, 产卵前表达量增加最大是在脑组织中, 为 1.314 (2.38 倍), 最小是在视叶中, 为 1.218(0.86 倍), 产卵中表达量高峰最大值是在脑组织中, 为 1.340 (2.43 倍), 最小是在胃中, 仅为 1.303(1.15 倍); 死亡前时期与幼乌贼时期相比表达量同样有所下降, 最小值是在视腺中, 仅为 0.356(0.34 倍), 最大值出现在脑中, 为 1.002(1.82 倍)。而在视腺组织中的表达(图 8)与 *Phb2* 的四阶段的分布量大致都呈现出先升高后降低的相同趋势, 产卵后时期为表达量最低的时期($P < 0.05$), 表达量与产卵中时期相比大幅下降, 仅为 0.03 倍。

3 讨论

Phb2 定位于线粒体并具有调整细胞周期进程, 转录调节, 调控发育以及调节肿瘤细胞增殖等功能^[3, 11-12]。对 *Phb2* 的研究内容较多, 但迄今有关抗增殖蛋白对头足类调节的研究报道较少。本研究利用曼氏无针乌贼转录组数据及 RACE 技术, 首次获得了曼氏无针乌贼 *Phb2* 基因全长, 多序列比对后发现, *Phb2* 基因具有高保守性, 系统进化分析显示在进化过程中保守性较高, 与其他物种的相似性在 71%~87%, 而且荧光定量 PCR 结果显示在各组织中均有表达, 这可能与 Prohibitin 蛋白的广泛存在性和高度保守性有关^[3]。

Phb 还涉及控制衰老, 包括其抗增殖功能和细胞周期控制功能^[5, 13-14]。*Phb2* 是一种多效性蛋

白, 据报道其在高等真核生物中对细胞增殖和发育过程中至关重要^[15-17]。曼氏无针乌贼在幼体时期, 荧光定量 PCR 检测其相对表达含量处于低水平阶段, 可能与其正处于细胞增殖期间有关。本实验中所取的幼乌贼为性腺分化早期的 12~30 d, 从组织学上来说属于第 I 期卵巢和第 II 期卵巢^[18-19], 细胞增殖旺盛, 细胞体积大幅增长, 由于 *Phb2* 对于细胞增殖起负调节作用^[20-21], 可能发挥了抗增殖活性, 其含量与细胞增殖负相关。

曼氏无针乌贼 *Phb2* 基因编码的蛋白在从幼乌贼期到产卵期之间表达量大幅提高, 这段时期雌乌贼的卵巢组织及卵细胞逐渐发育成熟, 说明促性腺激素的增长也使 *Phb2* 蛋白含量上调, 有学者发现, 在卵巢发育期间 *Phb2* 表达有所增高^[22], 本研究结论与其一致。在产卵到产卵后濒死前这段时期, *Phb2* 蛋白的相对表达量有所降低, 这可能说明了其对衰老的指示作用, 这也符合 Lumpkin 等^[23]的观察, prohibitin mRNA 和蛋白质在衰老细胞中以较低水平表达。另外, 在产卵前、产卵中和死亡前相较于其他组织, *Phb2* 蛋白在脑组织和肝组织中表达量较高, 这可能显示其在脑组织生长调节中发挥作用的可能性; 肝脏作为主要的解毒器官, 同时也是许多免疫因子的发生器官, 在肝中 prohibitin 表达类似于 p53^[24], *Phb2* 通过其与 E2F、pRb 和 p53 的相互作用在调节细胞周期进程中起关键作用^[8]。其显著下调的异常表达可能与肝癌^[25]等致癌作用相关, 可能由于癌细胞不断增殖, 线粒体含量也在增长, 主要位于线粒体内的 *Phb2* 含量也随之上调。

视腺(optic gland)是与生殖调控有关的内分泌器官, 可以调节性腺的发育和成熟以及其他生理行为。有研究发现章鱼(*Octopus hummelincki*)的视腺会影响其进食、生长、交配、就巢性和寿命^[26], 雌章鱼视腺分泌物的浓度达到极限值时, 会抑制进食, 随后死亡, 而移除视腺后, 寿命会得到延长。曼氏无针乌贼 *Phb2* 在视腺中的表达具有时期差异性, 表达量在产卵后下降, 说明 *Phb2* 在其中具有重要的周期调节、控制细胞衰老和凋亡的多效性功能。

综上所述, 本文报道了曼氏无针乌贼 *Phb2* 基

<i>Crassostrea gigas</i>	1	MDFPK-----LKD---ILAQ--GKKGGRICMGLMALAG-AAAGCQQSFYTVDGGRHS
<i>Azumapecten farreri</i>	1	MNFK-----DAQ---KMAP--GK-GIKACIGLLALAGGTIYGLTBSFYTVDGGRHS
<i>Aplysia californica</i>	1	MDFPK-----AADFAGRLKK--AGPRGIGAGLG--FALAS-GIYGVTCOSVYTVEGGHRA
<i>Sepiella japonica</i>	1	MDFPK-----LGDLANRIR--GGSKGLGAGVGLLAMAGGLAYGISQSIYTVEGGHRA
<i>Octopus bimaculoides</i>	1	MDFPK-----LADMLNRFR--GGSKPIITAGISLFAMAGGLAYGISQSIYTVDGGHRA
<i>Megachile rotundata</i>	1	MIDIK-----LPKTP-----QGLSVGLSCLAAAGMAAYGISRSMTVEAGHRA
<i>Cebuscapucinus imitator</i>	1	MAQN-----LKDLAGRLPA--GPRGMGTALKLLLGAGAVAYGVRESVFTVEGGHRA
<i>Rattus norvegicus</i>	1	MAQN-----LKDLAGRLPS--GPRGMGTALKLLLGAGAVAYGVRESVFTVEGGHRA
<i>Astyanax mexicanus</i>	1	MANKEPSKFLQLLRDISSRMSS--GSKAGAGLGLKLLIGAGALAYGVKEATYTVEGGQRA
<i>Acropora digitifera</i>	1	MADK-----FTTFAGRMG--KAPKGVCTGLKLLAAAVAYGVKBSIYTVDGGHRA
<i>Hydra vulgaris</i>	1	MAQL-----LKDFVAKYSN--GFPRGSTTGLSVLLGVGLVGVKBSLYTVDGGHRA
<i>Crassostrea gigas</i>	48	IIFSRIGGVQKQ-VLAEGLHFRVPWFQYPIIYDIRARPRKITSPTGSKDLQMVNISLRVL
<i>Azumapecten farreri</i>	48	IIFSRISGVQQT-VYFEGLHFRVPWFQYPIIYDIRARPRKISSPTGSKDLQMVNISLRVL
<i>Aplysia californica</i>	51	IIFSRISGKPD-IYVEGLHFKVPWFQYPIIYDIRSRPRKITSPTGSKDLQMVNISLRVL
<i>Sepiella japonica</i>	51	IIFSRIGGVKSD-IYAEGTHFRVPWFHYPPIIYDIRSKPRKISSPTGSKDLQMVNITLRVL
<i>Octopus bimaculoides</i>	51	IIFSRIGGIKKD-IYAEGLHFRIPWFHYPPIIYDIRARPRKISSPTGSKDLQMVNISLRVL
<i>Megachile rotundata</i>	44	IIFSRIGGVQOD-ILTEGLHFRVPWFHYPPIIYDIRSRPRKISSPTGSKDLQMVNISLRVL
<i>Cebuscapucinus imitator</i>	50	IIFENRIGGVQODTILAEGLHFRIPWFQYPIIYDIRARPRKISSPTGSKDLQMVNISLRVL
<i>Rattus norvegicus</i>	50	IIFENRIGGVQODTILAEGLHFRIPWFQYPIIYDIRARPRKISSPTGSKDLQMVNISLRVL
<i>Astyanax mexicanus</i>	58	IIVENRIGVMQMDTVLSEGLHFRIPWIQYPIIYDIRARPRKISSPTGSKDLQMVNIALRVL
<i>Acropora digitifera</i>	50	IIFSRIGGIQNN-IYTEGLHFRIPWFQYPIIYDIRSKPRKIVSPTGSKDLQMVNIGLRVL
<i>Hydra vulgaris</i>	51	IIFSRIGGIQNE-VYAEGLHFRIPWLQYPIIYDVRSRPRKISSPTGSKDLQMVNISLRVL
<i>Crassostrea gigas</i>	107	ARPDQIFLPQTYRQITGTDYDERVLPSICNEVLKSVVAKFNASQLITQRQQVSLIRRELTL
<i>Azumapecten farreri</i>	107	SRPDQNELPHIYRQLGQDYDERVLPSICNEVLKSVVAKFNASQLITQRQQVSLIRQELL
<i>Aplysia californica</i>	110	SRENATIALPHIYRQLGTDYDERVLPSICNEVLKSVVAKFNASQLITQRQQVSLIRRELTL
<i>Sepiella japonica</i>	110	SRPDALFLPIYMYRQLGLDYDERVLPSICNEVLKSVVAKFNASQLITQRQQVSLIRRQLL
<i>Octopus bimaculoides</i>	110	SRPDALHLPLMYRRLGLDYDERVLPSICNEVLKSVVAKFNASQLITQRQQVSLIRRELH
<i>Megachile rotundata</i>	103	SRPDASKLPIYVRHLGLDYDEKVLPSICNEVLKSVVAKFNASQLITQRQQVSLVRKELT
<i>Cebuscapucinus imitator</i>	110	SRENAQBLPSMYQRLGLDYDERVLPSIVNEVLKSVVAKFNASQLITQRAQVSLIRRELTL
<i>Rattus norvegicus</i>	110	SRENAQBLPSMYQRLGLDYDERVLPSIVNEVLKSVVAKFNASQLITQRAQVSLIRRELTL
<i>Astyanax mexicanus</i>	118	SREVASKLPMYQHLGKDYDERVLPSIVNEVLKSVVAKFNASQLITQRAQVSLIRRELF
<i>Acropora digitifera</i>	109	AREQASMLPEMFRRLGLDDEDERVLPSIMNEVLKSVVAKFNASQLITMRQEVSLIRRQLT
<i>Hydra vulgaris</i>	110	AREMASLPLQYRQLGLDDEDERVLPSICNEVLKSVVAKFNASQLITMRQEVSLIRRLDV
<i>Crassostrea gigas</i>	167	ERAQDEFIILDDVSITELSFSGKEYTAAVEAKQVAQQAQRAQFIVEKAKQERQOKIVQAD
<i>Azumapecten farreri</i>	167	DRARDEFIILDDVSITELSFSGKEYTAAVEAKQVAQQAQRAQFIVEKAKQERQOKIVQAT
<i>Aplysia californica</i>	170	QRAKDEFIILDDVSITELSFSGKEYTSAVESKQVAQQAQRAQFIVEKAKQERQOKIVQAE
<i>Sepiella japonica</i>	170	DRAKDEFIILDDVSITELSFSGREYTAAVEAKQVAQQAQRAQFIVEKAKQERQOKIVQAE
<i>Octopus bimaculoides</i>	170	NRAKDEFIILDDVSITELSFSGREYTAAVESKQVAQQAQRAQFIVEKAKQERQOKIVQAE
<i>Megachile rotundata</i>	163	ERARDENIILDDVSITELSFSGKEYTAAVESKQVAQQAQRAAFIVEKAKQERQOKIVQAE
<i>Cebuscapucinus imitator</i>	170	ERAKDESILDDVAITELSESREYTAAVEAKQVAQQAQRAQFIVEKAKQERQOKIVQAE
<i>Rattus norvegicus</i>	170	ERAKDESILDDVAITELSESREYTAAVEAKQVAQQAQRAQFIVEKAKQERQOKIVQAE

图 4 曼氏无针乌贼 Phb2 氨基酸序列与其他物种的 Phb2 氨基酸序列比对

各物种 Phb2 序列登录号 (The GenBank accession numbers of Phb2):

Acropora digitifera (XM_015920678.1): 鹿角珊瑚; *Aplysia californica* (XP_005107884.1): 加州海兔;
Astyanax mexicanus (XM_007248243.1): 墨西哥脂鲤; *Azumapecten farreri* (AIA77461.1): 栉孔扇贝;
Cebuscapucinus imitator (XM_017517009.1): 卷尾猴; *Crassostrea gigas* (XM_011429614.1): 长牡蛎;
Hydra vulgaris(XM_002163729.3): 水蛭; *Megachile rotundata* (XP_012139789.1): 苜蓿切叶蜂;
Octopus bimaculoides (XP_014771498.1): 加州双斑蛸; *Rattus norvegicus* (NM_001013035.1): 褐家鼠.

Fig. 4 The amino acid sequence of *Sepiella japonica* Phb2 alignment with other species

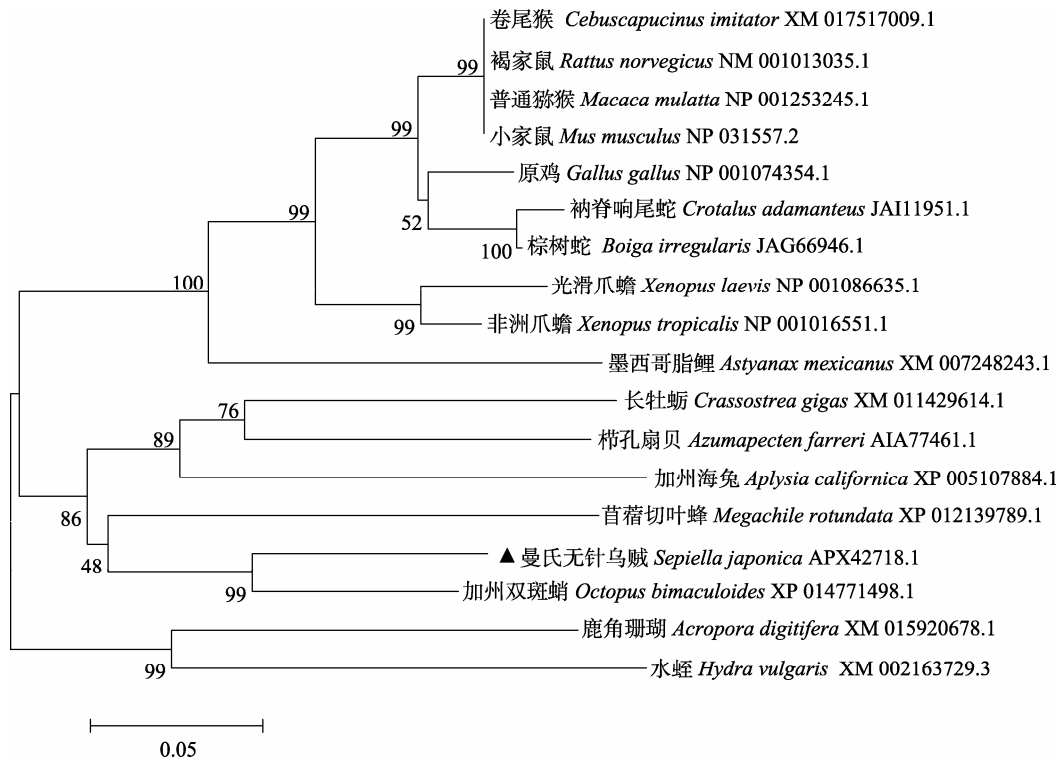


图 5 基于 *Phb2* 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树
分叉处数值表示 1000 次重复抽样所得到的置信度; 标尺长度表示每个位点发生 0.05 次置换。
Fig. 5 NJ phylogenetic tree of *Phb2* based on the sequences of different species
The bifurcation value represents the confidence obtained by repeating the sampling of 1000 times;
The ruler length represents 0.05 substitutions per site.

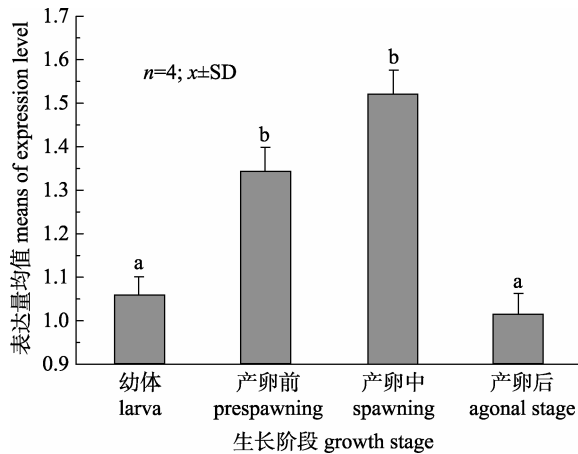


图 6 *Phb2* 在曼氏无针乌贼不同生长阶段的表达情况
不同字母表示在不同生长阶段中差异显著($P<0.05$)。
Fig. 6 The expression of *Phb2* in different growth stage of *Sepiella japonica*
Different letters denote significant differences between different growth stage ($P<0.05$).

因的分子特征, 并对其在不同生长时期的表达及组织特异性表达进行了相关研究, 但由于衰老机制的复杂性, 具体 *Phb2* 在曼氏无针乌贼中介导

的信号通路、与衰老的关系及调节机制等仍需进一步的深入研究。

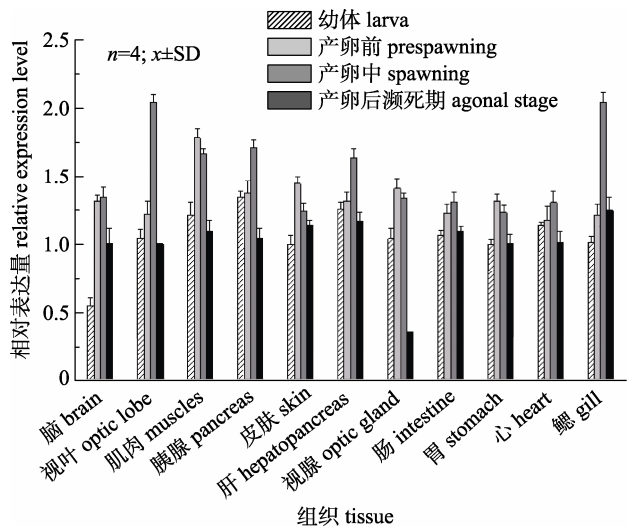


图 7 曼氏无针乌贼 *Phb2* 基因在不同生长阶段各组织中的表达情况
Fig. 7 Expression of *Phb2* in various tissues in different growth stages of *Sepiella japonica*

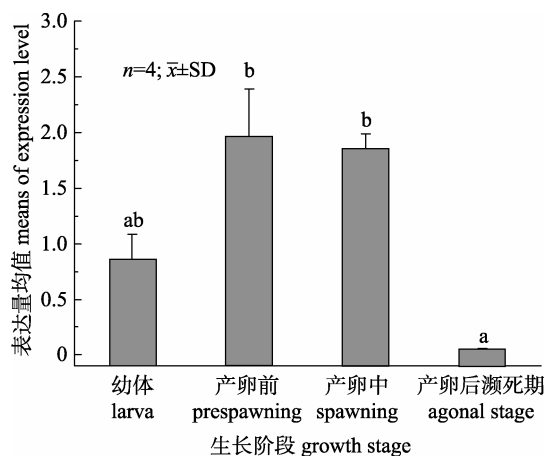


图 8 *Phb2* 在曼氏无针乌贼视腺组织中不同阶段表达情况
不同字母表示在视腺中差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 8 The expression of *Phb2* in optic gland in different growth stage of *Sepiella japonica*
Different letters denote significant differences within optic gland ($P<0.05$).

参考文献:

- [1] Laptikhovsky V V, Arkhipkin A I, Hoving H J T. Reproductive biology in two species of deep-sea squids[J]. Marine Biology, 2007, 152(4): 981-990.
- [2] Chen K J. Aging China: Problems and Countermeasures[M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2000: 129-149. [陈可冀. 老龄化中国: 问题与对策[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2000: 129-149.]
- [3] McClung J K, Jupe E R, Liu X T, et al. Prohibitin: potential role in senescence, development, and tumor suppression[J]. Experimental Gerontology, 1995, 30(2): 99-124.
- [4] Wang S, Nath N, Fusaro G, et al. Rb and prohibitin target distinct regions of E2F1 for repression and respond to different upstream signals[J]. Molecular & Cellular Biology, 1999, 19(11): 7447-7460.
- [5] Dixit V D, Sridaran R, Edmonson M A, et al. Gonadotropin-releasing hormone attenuates pregnancy-associated thymic involution and modulates the expression of antiproliferative gene product prohibitin[J]. Endocrinology, 2003, 144(4): 1496-1505.
- [6] Van Aken O, Whelan J, Van Breusegem F. Prohibitins: mitochondrial partners in development and stress response[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(5): 275-282.
- [7] Mishra S, Ande S R, Nyomba B L. The role of prohibitin in cell signaling[J]. FEBS Journal, 2010, 277(19): 3937-3946.
- [8] Fusaro G, Dasgupta P, Rastogi S, et al. Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(278): 47853-47861.
- [9] Zhu L J, Pan X D, Wang L. Advances in anti-tumor and anti-aging function of anti-proliferating protein Prohibitin[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2010, 11(30): 3197-3200. [祝丽晶, 潘旭东, 王翎. 抗增殖蛋白抗肿瘤及抗衰老的研究进展[J]. 中国老年杂志. 2010, 11(30): 3197-3200.]
- [10] Dell'Orco R T, McClung J K, Jupe E R, et al. Prohibitin and the senescent phenotype[J]. Experimental Gerontology, 1996, 31(1-2): 245-252.
- [11] Sievers C, Billig G, Gottschalk K, et al. Prohibitins are required for cancer cell proliferation and adhesion[J]. PLoS ONE, 2012, 5(9): e12735.
- [12] Piper P W, Bringloe D. Loss of prohibitins, though it shortens the replicative life span of yeast cells undergoing division, does not shorten the chronological life span of go-arrested cells[J]. Mechanisms of Ageing & Development, 2002, 123(4): 287-295.
- [13] Coates P J, Nenutil R, Mc Gregor A, et al. Mammalian prohibitin proteins respond to mitochondrial stress and decrease during cellular senescence[J]. Experimental Cell Research, 2001, 265(2): 262-273.
- [14] Merkwirth C, Dargazanli S, Tatsuta T, et al. Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria[J]. Genes & Development, 2008, 22(4): 476-488.
- [15] Merkwirth C, Langer T. Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2009, 1793(1): 27-32.
- [16] Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Prohibitin and mitochondrial biology[J]. Trends Endocrinol Metab, 2009, 20(8): 394-401.
- [17] Gong Q X, Du L Q. The annual change of the ovary of cuttle fish (*Sepiella maindroni*, De Rochebrune) in the waters of Zhejiang province[J]. Journal of Fisheries of China, 1988, 12(1): 192. [龚启祥, 杜立勤. 浙江近海曼氏无针乌贼卵巢周年变化的研究[J]. 水产学报, 1988, 12(1): 192.]
- [18] Jia X M, Fu F Y, Li Z, et al. Study on the oogenesis and ovaria development of *Sepiella maindroni*[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(5): 607-617. [蒋霞敏, 符方尧, 李正, 等. 曼氏无针乌贼的卵子发生及卵巢发育[J]. 水产学报, 2007, 31(5): 607-617.]
- [19] Nuell M J, Stewart D A, Walker L, et al. Prohibitin, an evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblasts and HeLa cells[J]. Molecular & Cellular Biology, 1991, 11(3): 1372-1381.
- [20] Makrigiannakis A, Amin K, Coukos G, et al. Regulated expression and potential roles of p53 and Wilms'tumor-suppressor gene (WT1) during follicular development in the human ovary[J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,

- 2000, 85(1): 449-459.
- [21] Thompson W E, Powell J M, Whittaker J A, et al. Immunolocalization and expression of prohibitin, a mitochondrial associated protein within the rat ovaries[J]. *Anatomical Record*, 1999, 256(1): 40-48.
- [22] Lumpkin C K, Mcclung J R, Pereira-Smith O M, et al. Existence of high abundance anti-proliferative mRNA's in senescent human diploid fibroblasts[J]. *Science*, 1986, 232(4748): 393-395.
- [23] Tompson A L, Mead J E, Braun L, et al. Sequential protooncogene expression during rat liver regeneration[J]. *Cancer Research*, 1986, 46(6): 3111-3117.
- [24] Jang J S, Cho H Y, Lee Y J, et al. The differential proteome profile of stomach cancer identification of the biomarker candidates[J]. *Oncology Research*, 2004, 14(10): 491-499.
- [25] Wodinsky J. Hormonal inhibition of feeding and death in Octopus: Control by optic gland secretion[J]. *Science*, 1977, 198(4320): 948-951.

Cloning of the *Phb2* gene and analysis of its developmental stage distribution in *Sepiella japonica*

WU Yuting¹, GUO Baoying¹, QI Pengzhi¹, LYU Zhenming¹, WU Changwen¹, SHI Huilai², PING Hongling²

1. National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China

2. Zhejiang Province Key Lab of Mariculture and Enhancement, Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, ZhouShan 316021, China

Abstract: Aging and death are very complex biological phenomena. In recent years, aging has become an important research topic. Researchers have explored the mechanisms of aging at the cellular and molecular levels. *Sepiella japonica* is widely distributed in China's coastal areas, with high food, medicinal, and economic value; it is an important cephalopod of economic value in China. It usually dies after spawning, which is a common characteristic of cephalopods. However, the lifecycle and aging-related mechanisms in this squid are still unknown. In this study, we used *S. japonica* to examine prohibitin, which is a highly conserved protein that is widely present in eukaryotes from yeasts to mammals and plays an important role in cell cycle management, differentiation, aging, and anti-proliferative activity. *Phb2* is a subtype of Prohibitin. We first acquired the *Phb2* gene using rapid amplification of the cDNA end (RACE) technique. The full length of the sequence was 1283 bp, containing a 5'-untranslated region (5'-UTR) of 150 bp, a 3'-untranslated region (3'-UTR) of 236 bp, and an open reading frame (ORF) of 897 bp that was predicted to encode 298 amino acids. Sequence analysis showed that the protein encoded by the *Phb2* gene did not contain a signal peptide, but contained a domain of the PHB family, and the fragment including 20aa to 42aa was a transmembrane structure. The sequence was 87% similar to *Octopus bimaculoides*. Phylogenetic analysis showed that *S. japonica* is clustered with mollusks and arthropods, and the chordate is another, which is in accordance with traditional taxonomy. The expression of *Phb2* was detected using quantitative real-time PCR on tissues of *S. japonica* at different growth stages (larvae, spawning, spawning-and-postpartum). The results showed that the *Phb2* gene was expressed in all four developmental stages. The expressions were lower in the larvae and spawning-and-postpartum stages and relatively high during spawning and spawning. Expressions in brain and liver tissues were high at all stages. The optic gland, an endocrine organ, was associated with reproductive regulation, and its *Phb2* gene expression showed variation over time. Expression of the *Phb2* gene was significantly decreased after spawning, which indicated that *Phb2* had pleiotropic functions of cycle regulation, controlling cell senescence, and apoptosis. The results of this study provide a basis for further study on the anti-aging effects of Prohibitin2 in *S. japonica* and its expression in cephalopods, and also provides some theoretical basis and information for the causes of senility and senescence mechanisms in marine cephalopods.

Key words: anti-proliferation protein of *Phb2*; expression analysis; *Sepiella japonica*; anti-aging function

Corresponding author: GUO Baoying. E-mail: guobaoying@zjou.edu.cn