文章编号：1674－5566(2012)02－0183－07

斑节对虾钙网蛋白基因 cDNA 克隆和表达分析

郑丽明[1,2]，周发林[1]，杨其彬[1]，黄建华[1]，邱丽华[1]，苏天凤[1]，杨丽诗[1]，江世贵[1]

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所，广东 广州 510300；2. 华南农业大学 动物科学学院，广东 广州 510642)

摘 要：采用 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)获得了 1 672 bp 的斑节对虾钙网蛋白(*Penaeus monodon* calreticulin，PmCRT)基因 cDNA 序列。该序列包含 37 bp 的 5′非编码区(UTR)和414 bp 的3′非编码区(UTR)以及1 221 bp 的开放阅读框(ORF)，可编码 406 个氨基酸。预测的分子量约为 46.8 ku，理论等电点为 4.13。序列比对分析表明 PmCRT 与中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的相似性和同源性最高，分别为 100% 和 98.8%。实时荧光定量 PCR 对组织表达检测的结果可知，PmCRT 的 mRNA 在卵巢、肝胰腺、肌肉、脑、心脏、胃、眼柄和肠均有表达，卵巢的表达量最高，肌肉次之；对卵巢发育 6 期变化检测可知，PmCRT 的 mRNA 在Ⅲ期卵巢表达量最高，Ⅰ期的表达量最低。以期为进一步研究该基因在斑节对虾卵巢发育中的作用提供基础数据。

研究亮点：目前对斑节对虾卵巢发育的分子调控机理还知之甚少，有大量卵巢发育相关基因还不为人所知。本文研究了钙网蛋白在斑节对虾卵巢发育各期的表达谱，为阐明斑节对虾卵巢发育分子调控机理提供基础数据。

关键词：斑节对虾；钙网蛋白；克隆；组织表达

中图分类号：S 917；Q 959.223

文献标志码：A

钙网蛋白是内质网和肌浆网中主要的 Ca^{2+} 结合蛋白，由单一基因编码，具有高度的进化保守性，能调节细胞多种生理功能，如作为凝集素样分子伴侣，协助蛋白质正确折叠、维持细胞 Ca^{2+} 稳态、参与调节细胞凋亡、黏附、类固醇敏感性基因表达和自身免疫反应等[1]。

研究显示，高等动物(如人类、小鼠和猫等)的钙网蛋白在其生殖方面也起着重要作用。MICHALAK 等[2]在体外实验表明 CRT N-结构域与类固醇受体的 DNA 结合域、含 KXGFFKR 序列的转录因子结合，抑制其与 DNA 相互作用；在体内实验显示由糖皮质激素、雄性激素、维 A 酸、维生素 D 受体引起的基因转录活化，在 CRT 过表达细胞中受抑制。STEVEN 等[3]的研究结果表明 CRT 具有促进生殖细胞发育的功能。BALAKIER 等[4]的研究表明钙网蛋白在人类卵母细胞成熟、受精和早期胚胎发育中对 Ca^{2+} 短暂细微调节中发挥关键作用。ZHANG 等[5]研究表明在猪卵母细胞和胚胎发育的过程中，钙网蛋白参与 Ca^{2+} 动态平衡的调节。因此，CRT 可能在动物的生殖或繁育过程中具有调节作用。在无脊椎动物 CRT 研究方面，至今已从中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)、加利福尼亚海兔(*Aplysia californica*)中成功获得 CRT 的基因[6-10]，其功能的研究主要集中在它与自身免疫疾病的关系。目前未见有关斑节对虾 CRT 基因相关于卵巢发育功能方面的研究和报道。

斑节对虾(*Penaeus monodon*)是我国南方重要对虾养殖种类。到目前为此，对其繁殖与成熟的许多机理仍然不是十分清楚，特别是其卵巢发育分子调控机理。已有的研究表明，钙网蛋白在

收稿日期：2011-09-24 **修回日期**：2011-12-01

基金项目：国家自然科学基金(40976101)；广东省海洋与渔业科技推广专项(A200901B02，A201001B01)；虾产业技术体系(CARS－47)

作者简介：郑丽明(1985—)，女，硕士研究生，研究方向为海洋生物分子生物学。E-mail：ivy198524@126.com

通讯作者：江世贵，E-mail：jiangsg@21cn.com

人类等高等动物中生殖细胞中起着重要作用。因此,本研究克隆分析 PmCRT 的 cDNA 序列,并对其在斑节对虾不同组织及不同发育期卵巢中的表达模式进行了分析,以期为斑节对虾卵巢发育的分子调控机理提供一定的基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用斑节对虾(*Penaeus monodon*)来源于海南省三亚市附近海域及对虾养殖池塘(经过催熟),其卵巢发育分别有Ⅰ期(养殖对虾)、Ⅱ期至Ⅵ期(经过催熟的三亚市附近海域野生对虾)的个体,体重 20 ~ 300 g,用于 cDNA 文库的构造和 EST 分析,cDNA 克隆,组织表达实验。实验用虾在水温(25 ± 1)℃、盐度为 30 的循环水池中暂养 3 d 后使用。

cDNA 文库是以成熟斑节对虾的卵巢和神经内分泌器官——眼柄作为材料,使用 ZAP-cDNA synthesis kit 和 ZAP-Cdna Gigapack Ⅲ Gold cloning kit (stratagene) 构建的。在文库中采用通用 T3 引物进行随机测序,可获得 6 782 个成功的测序反应。所有获得的 EST 序列进行 BLAST 分析,结果显示一条 480 bp 的 EST 序列(EST no. Contig94)与美国龙虾(*Homarus americanus*)的 CRT 基因有较高的同源性(82%)。

1.2 克隆 PmCRT 的 cDNA 全长

根据已经鉴定的斑节对虾 EST 文库中 CRT 基因片段设计 5′端和 3′端特异性引物(F1、F2、R1、R3),见表 1,采用 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends,RACE)扩增 MT cDNA 的 5′和 3′末端。

在 3′RACE 中,利用半巢式(Semi-nested)PCR 方法,首先由 F1 和接头引物进行 PCR 反应,所得产物稀释 100 倍后,取 1 μL 作为模板,利用 F2 和接头引物再进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:10 × PCR 反应缓冲液 2.5 μL,2.5 mmol/L dNTP 1.5μL,10 nmol/L 引物各 1 μL,1 000 U Ex *Taq* 酶 0.25 μL,1 μL cDNA 模板,用三蒸水将反应体系补充至 25 μL。反应条件为:94 ℃变性 3 min;94 ℃ 35 s,56 ℃ 35 s,72 ℃ 40 s,35 个循环;72 ℃延伸 8 min。在 5′RACE 中,利用末端转移酶和 dCTP 在 cDNA 末端加上 ploy(C)尾后,以加尾后的 cDNA 作为模板,利用特异性引物 R1 和 Oligo-dG 进行第一次 PCR 扩增,所得产物稀释 10 倍后取 1 μL 作为模板,再利用 R2 和 Oligo-dG 进行第 2 次 PCR 扩增。

所得的 PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶回收试剂盒(OMEGA)对目的片段进行纯化,纯化产物与 pMD-18T 载体(TaKaRa)连接,转化于大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α,将 PCR 检测为阳性的克隆送上海英骏生物科技有限公司测序。

表 1 PmCRT cDNA 全长扩增及表达所用的引物
Tab. 1 Primers used to amplify the PmCRT cDNA full length and real-time PCR

引物	引物序列(5′-3′)
F1	TCCCACTCGCCATCCATTTC
F2	GGTTCTCACCCTTGTAATTG
R1	CCTCATTATGTTTGGTCCTG
R2	GATGAAATGGATGGCGAGTG
接头引物	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Oligo-dG	GGGGGGGGGGGGGG
rFCa	AAGAAGGAAATCCGTTGC
rRCa	GTCCTCAGGTTTGGTGGC
actin2F	GGTATCCTCACCCTCAAGTA
actin2R	AAGAGCGAAACCTTCATAGA

1.3 序列分析

使用 DNAstar 对 PmCRT 的氨基酸序列进行预测;扩增序列同源性比对和相似性搜索用 NCBI 网站上的 BLAST 程序(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)进行;用 Clustal X 1.81 软件进行多序列比对;利用 DNATool 6.0 软件预测氨基酸序列;信号肽预测用 SingalP 3.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)程序;蛋白结构域分析用 SMART 4.0(http://smart.embl-heidelberg.de/)程序和 ScanProsite(http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/)在线程序;糖基化位点预测采用 NetNGlyc 1.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)程序;磷酸化位点预测采用 NetPhos 2.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/)程序;核苷酸序列同源性和相似性分析用 MatGAT 2.01 软件;采用 Clustal X 1.81 软件和 Mega 4.0 软件,以邻位相连(Neighbor-joining,NJ)法构建进化树。

为检测 PmCRT 在不同组织器官的表达水平,取 3 尾健康成熟的斑节对虾(体重约 150 g)的卵巢、肝胰腺、脑、肠和胃等组织,按 QIAGEN

RNeasy Mini Kit 的说明书提取各组织的总 RNA。

为检测 PmCRT 在 6 个卵巢发育时期的表达水平,卵巢发育 6 期各取 3 尾斑节对虾的卵巢样品,按 QIAGEN RNeasy Mini Kit 的说明书提取各组织的总 RNA。根据黄建华等[10]的研究,通过解剖学、组织学和分类学的方法确定所取卵巢样品的发育阶段,6 期分别为——Ⅰ期(卵原细胞期)、Ⅱ期(核染色质期)、Ⅲ期(周边核仁期)、Ⅳ期(卵黄囊期)、Ⅴ期(成熟期)和Ⅵ期(枯竭期或恢复期)。

分别测量样品在 260 nm 和 280 nm 波长的吸光度值,计算 RNA 样品的浓度和纯度,按 Prime Script™ RT reagent Kit(TaKaRa)操作手册进行反转录为 cDNA 模板。将同一组织或同一卵巢发育阶段的 3 个 cDNA 模板混合,稀释 5 倍于 -80 ℃储存用于实时荧光定量实验。

根据斑节对虾 MT 基因保守序列设计引物 rFMT、rRMT,内参 β-actin 的引物 actinF 以及 actinR(表 1),分别用这两对引物进行 RT-PCR 扩增。按照 SYBR Premix Ex *Taq*™(TaKaRa) Kit 说明在 Eppendorf X22770P 荧光定量 PCR 仪上进行反应,扩增体系为:2 × SYBR Green RT-PCR Master Mix 10 μL,10 nmol/L 引物各 0.4 μL,cDNA 模板 1 μL,用 ddH_2O 补充至 20 μL。扩增条件为 95 ℃ 2 min,40 个循环的条件是 15 ℃ 15 s,56 ℃ 15 s,72 ℃ 30 s,最后进行溶解曲线分析。

样品和内参均设 3 个重复,分别以心脏和卵巢Ⅰ期作为对照。采用相对 CT 法对实时荧光 PCR 扩增数据进行处理,目的基因相对含量 = $2^{-平均\Delta\Delta CT}$,其中 $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{样本} - \Delta CT_{对照}$,$\Delta CT = CT_{样本或对照} - CT_{内参}$。处理后的数据运用 SPSS 16 医学分析软件进行方差分析,$P < 0.05$ 为差异显著。

2　结果

2.1　PmCRT 基因的克隆和氨基酸序列特征分析

PmCRT 的 cDNA 全长(GenBank 登录号:HQ259085)由 1 672bp 组成,其开放阅读框(open reading frame,ORF)有 1 221 bp,编码 406 个氨基酸。在第一个起始密码子 ATG 的上游有 37 bp 的非编码区,在终止密码子下游有 414 bp 的非编码区,序列包含 poly(A),AATAA 为典型的多聚腺苷酸加尾信号序列。氨基酸组成分析表明,天冬氨酸含量最高,达 15.27%;谷氨酸、赖氨酸含量较高,分别为 11.08% 和 10.34%。预测该蛋白的分子量为 46.8 ku,理论等电点 4.13,为酸性蛋白。利用 SignalP 3.0 在线程序分析表明 PmCRT 有 17 个氨基酸组成的信号肽序列(Met^1-Ser^{17}),序列为 MKTWVFLALFGVALVES。

利用 NetNGlyc 1.0 对 PmCRT 推测的氨基酸序列进行糖基化位点预测,发现 PmCRT 含有 2 个潜在的糖基化位点,分别是 Thr^{229} 和 Thr^{246}。

利用 NetPhos 2.0 对 PmCRT 推测的氨基酸序列进行磷酸化位点预测,发现 PmCRT 含有 20 个潜在的磷酸化位点,包括 5 个 Ser 位点(Ser^{27},Ser^{76},Ser^{83},Ser^{124} 和 Ser^{191})、9 个 Thr 位点(Thr^{66},Thr^{77},Thr^{139},Thr^{179},Thr^{222},Thr^{229},Thr^{246},Thr^{298} 和 Thr^{344})和 6 个 Tyr 位点(Tyr^{126},Tyr^{180},Tyr^{269},Tyr^{283},Tyr^{297} 和 Tyr^{304})。

结合 BLAST 分析结果,利用 Clustal X 1.81 软件将 PmCRT 基因预测的氨基酸序列与人钙网蛋白(NP_004334.1),小家鼠钙网蛋白(NP_031617.1),非洲爪蟾钙网蛋白(NP_001080096.1),斑马鱼钙网蛋白(NP_956007.1),中国明对虾(ABC50166.1)和合浦珠母贝(ABR68546.1)进行对比和分析(图 1)。结合 ScanProsite 在线程序分析显示,PmCRT 含有 2 个钙网蛋白家族签名序列,分别为 K^{96}HEQNIDCGGGYLKVF^{111} 和 I^{128}MFGPDICG^{136},Cys^{103} 和 Cys^{135} 形成二硫键,可结合 ATP 或 Zn^{2+} 发生构象改变,调节 CRT 与未折叠蛋白的结合能力;3 个钙网蛋白家族重复基元签名序列,分别是 I^{206} KDPEAKKPDDWD^{218}、I^{223} ADPDDTKPEDWD^{235} 和 I^{240} PDPDATKPEDWD^{252},具有很高的保守性;以及在最靠近终止密码子的序列 H^{403}DEL^{406} 作为内质网滞留信号的四肽序列,可靶向性引导 CRT 定位于内质网,该区域有较高的 Ca^{2+} 结合容量,但亲和力低。

2.2　同源性分析

在蛋白质数据库中通过 BLAST 对 PmCRT 基因编码的蛋白的氨基酸序列进行同源性检索(NCBI),运用 MatGat 软件对其进行同源性和相似性分析。表 2 结果表明:PmCRT 与中国明对虾钙网蛋白的相似性和同源性都最高,分别为 100% 和 98.8%。

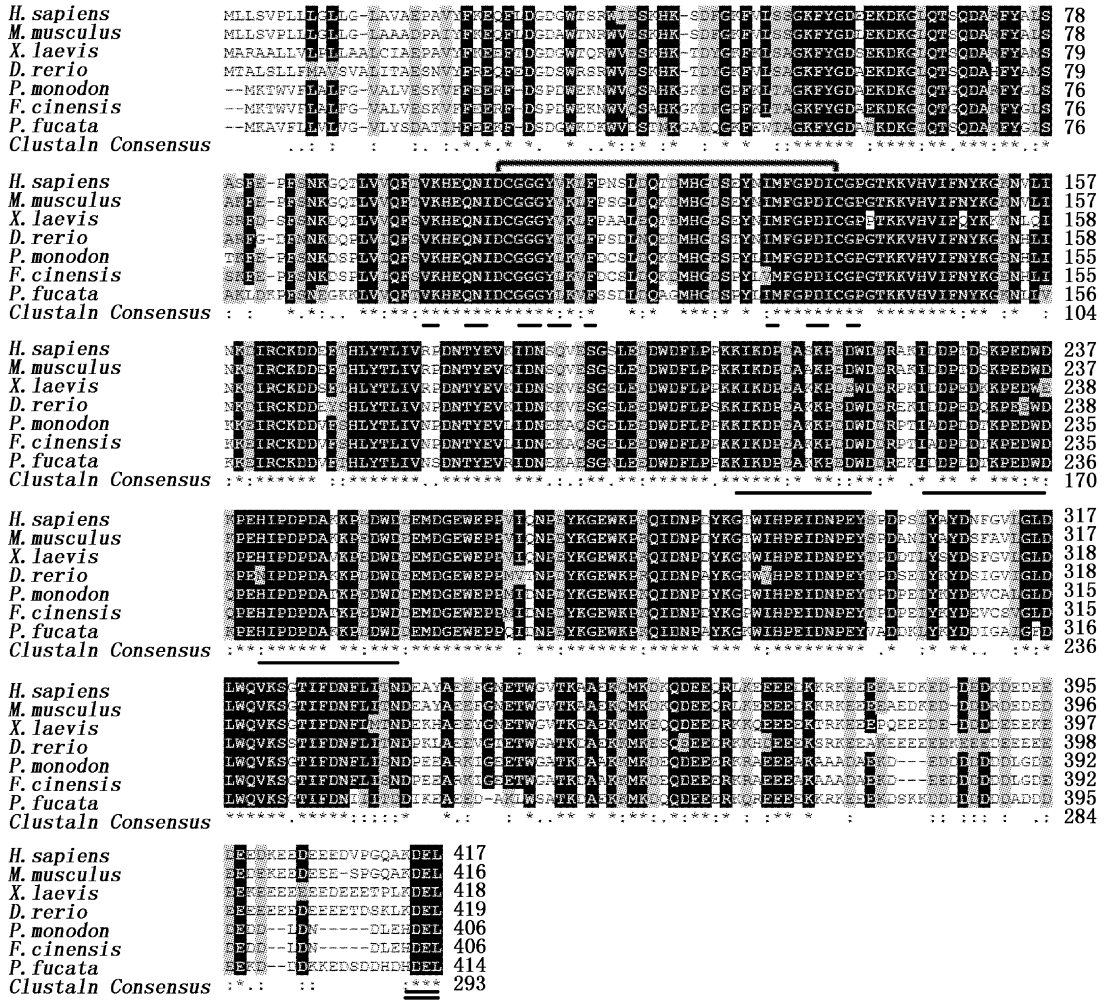

图 1 PmCRT 与预测的氨基酸和其他物种钙网蛋白多序列比对

Fig. 1 Multiple alignment of PmCRT amino acid sequences with other species calreticulin amino acid sequences

* 代表同源性;. 或:代表相似性;钙网蛋白家族签名序列用下划虚线表示;标签中保守的 2 个半胱氨酸形成 1 个二硫键以线段相连接;钙网蛋白家族重复基元签名序列和内质网定位序列 K/HDEL 分别用单下划线和双下划线标在序列下方。

根据 PmCRT 及其他物种的 CRT 氨基酸序列,使用 Clustal X 1.81 软件和 Mega 4.0 软件,采用 NJ(参数:10 000 replicates, boostrap phylogeny test)法构建了它们的系统进化树(图 2)。从系统树上可看出,脊椎动物和无脊椎动物的钙网蛋白分别聚成两大支,在脊椎动物一支中哺乳动物先聚在一起,再与鸟类原鸡(GgCRT)、两栖类非洲爪蟾(XlCRT)聚合,最后与鱼类斑马鱼(DrCRT)、尖吻鲈(LcCRT)聚合;在无脊椎动物一支中,斑节对虾先与同为甲壳类动物的中国明对虾(FcCRT)聚在一起,再与昆虫大蜡螟(GmCRT)、黑腹果蝇(DmCRT)聚合,最后与软体动物鲑疮痂鱼虱(LsCRT)、长牡蛎(CgCRT)、合浦珠母贝(PfCRT)聚合。

2.3 斑节对虾钙网蛋白基因 mRNA 的表达分析

以 rFCa 和 rRCa 为引物,对斑节对虾的 7 种组织样品进行实时荧光 PCR 扩增,每种样品设 3 个重复。PCR 扩增结束后所得的溶解曲线为单峰,无杂峰,表明试验无污染,无非特异性产物。同时 PCR 扩增曲线也显示出,每种样品的重复性较好。对实验数据进行相对 CT 法分析,斑节对虾钙网蛋白 mRNA 在卵巢、肝胰腺、肌肉、心脏、胃、眼柄和肠均有表达,在卵巢内的表达量最高,肌肉次之,而在心脏的表达量最低。PmCRT mRNA 在卵巢的相对表达量是心脏的 125.5 倍,是肌肉的 2.2 倍。经单因子方差分析,斑节对虾钙网蛋白 mRNA 在组织表达中存在显著差异,具体如图 3 所示。

表 2　PmCRT 与其他物种钙网蛋白氨基酸序列同源性分析

Tab. 2　Homology analysis of PmCRT with other known calreticulin amino acid sequences

物种	缩写	登录号	相似性/%	同源性/%
中国明对虾 *Fenneropenaeus chinensis*	Fc	ABC50166.1	100.0	98.8
鲑疮痂鱼虱 *Lepeophtheirus salmonis*	Ls	ACO12974.1	82.3	68.9
长牡蛎 *Crassostrea gigas*	Cg	BAF63639.1	82.6	71.0
合浦珠母贝 *Pinctada fucata*	Pf	ABR68546.1	82.4	71.3
大蜡螟 *Galleria mellonella*	Gm	BAB79277.1	83.5	71.6
黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*	Dm	CAA45791.1	81.3	69.3
斑马鱼 *Danio rerio*	Dr	AAF13700.1	78.9	64.0
尖吻鲈 *Lates calcarifer*	Lc	ADQ92842.1	78.8	66.3
非洲爪蟾 *Xenopus laevis*	Xl	CAA47866.1	80.3	66.0
原鸡 *Gallus gallus*	Gg	AAS49610.1	80.8	67.9
家兔 *Oryctolagus cuniculus*	Oc	AAB20096.1	78.1	65.9
人类 *Homo sapiens*	Hs	AAB51176.1	78.9	67.7
小家鼠 *Mus musculus*	Mm	AAH03453.1	78.6	67.7

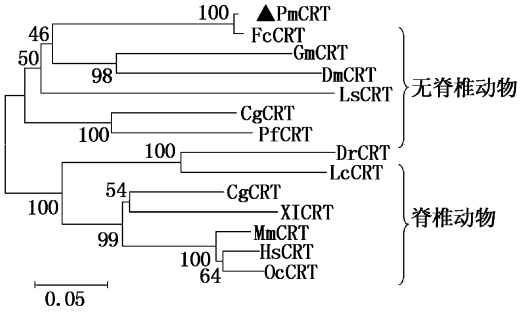

图 2　利用 Clustal X 程序和 Mega 4.0 软件构建的 PmCRT 系统进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree of PmCRT by Clustal X and Mega 4.0

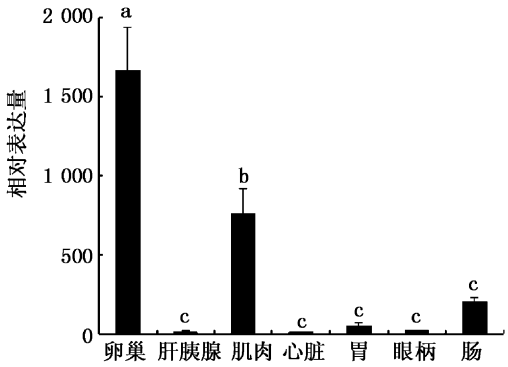

图 3　斑节对虾 PmCRT 基因 mRNA 组织表达模式

Fig. 3　RT-PCR analysis of PmCRT expression in various tissues of *Penaeus monodon*

不同的字母表示存在显著性差异($P<0.05$)。

以 rFCa 和 rRCa 为引物,利用实时荧光定量 PCR 检测 PmCRT mRNA 在斑节对虾卵巢发育Ⅰ期(卵原细胞期)、Ⅱ期(核染色质期)、Ⅲ期(周边核仁期)、Ⅳ期(卵黄囊期)、Ⅴ期(成熟期)、Ⅵ期(枯竭期或恢复期)的相对表达量,每种样品设 3 个重复。PCR 扩增结束后所得的溶解曲线为单峰,无杂峰,表明试验无污染,无非特异性产物。同时 PCR 扩增曲线也显示出每种样品的重复性较好。对实验数据进行相对 CT 法分析,PmCRT 的 mRNA 在Ⅲ期卵巢表达量最高,Ⅰ期的表达量最低。在Ⅲ期卵巢中,PmCRT mRNA 相对表达量是在Ⅰ期中的 12.4 倍,是在Ⅴ期中的 1.6 倍。经单因子方差分析,斑节对虾钙网蛋白 mRNA 在卵巢 6 期的表达中存在显著差异,具体如图 4 所示。

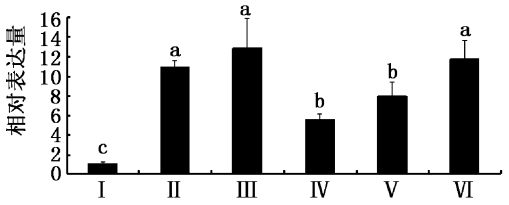

图 4　斑节对虾 PmCRT 基因 mRNA 卵巢发育六期表达模式

Fig. 4　RT-PCR analysis of PmCRT expression in different ovarian development stages

不同的字母表示存在显著性差异($P<0.05$)。

3　讨论

本实验以斑节对虾为研究对象,通过 RACE 克隆获得 PmCRT cDNA 全长序列。经过 BLAST

同源比对分析,发现 PmCRT 与其他已知物种 CRT 家族基因具有极高保守性,不仅均含有 2 个 CRT 家族签名序列,且含有多个 CRT 家族重复基元签名序列 IxDxExxKPE(/D) DWD[6]。CRT 属于 K/HDEL(作为内质网滞留信号的四肽序列)蛋白家族[11],在所编码氨基酸的末端都含有序列 K/HDEL,可靶向性引导 CRT 定位于内质网。

组织表达分析表明,斑节对虾钙网蛋白 mRNA 在卵巢、肝胰腺、肌肉、脑、心脏、胃、眼柄和肠均有表达,在卵巢内的表达量最高,肌肉次之,而在脑的表达量最低。LUANA 等[6] 利用 Northern blotting 的方法检测中国明对虾 CRT 的组织表达模式,研究表明 FcCRT 在肌肉、腮、淋巴细胞、肠、血细胞和卵巢均有表达,其中在卵巢中的表达量最高;利用原位混合法检测结果表明 FcCRT 在肝胰腺、血细胞、腮、肠和卵巢均有表达,表达量最高的还是卵巢。由此可认为,PmCRT 与中国明对虾 CRT 在组织表达具有相似的特征。

在 6 个不同发育期卵巢表达中,PmCRT mRNA 在Ⅰ期卵巢中表达量最低,Ⅱ、Ⅲ期上升至最高,Ⅳ期立刻降至Ⅲ期的一半,Ⅴ、Ⅵ期再上升至约为Ⅱ、Ⅲ期的表达量。在Ⅱ、Ⅲ和Ⅵ期中,PmCRT mRNA 的相对表达量较高;在Ⅳ、Ⅴ期中的次之;在Ⅰ期中的最低,存在显著差异。FAIRSA 等[12]对斑节对虾的研究检测出卵巢中共轭形式的 17β-雌二醇、共轭形式及游离的雌酮在卵黄发生前期及卵黄发生期含量大,而游离的黄体酮在卵黄发生期及成熟期被检测到。张成锋等[13]对克氏原螯虾卵巢中黄体酮和雌二醇的含量检测,发现随着卵黄积累的过程,在卵黄发生前期到次级卵黄发生期,这两种激素的含量逐渐递增,而且保持在较高水平,到成熟期则有所下降。PmCRT 第一个表达高峰期在Ⅲ期(周边核仁期),这与甾体激素在卵巢含量的变化趋势较为相似。而且 MICHALAK 等[2]的研究表明 CRT N-结构域能与类固醇受体的 DNA 结合域相互作用,在小鼠体内实验显示由糖皮质激素受体引起的基因转录活化,在 CRT 过表达细胞中受抑制;STEVEN 等[3]认为人类 CRT 具有雌激素受体伴侣功能,进而推测 CRT 具有促进生殖细胞发育的功能。鉴于 PmCRT 与人类、小家鼠 CRT 的相似性大于 75%,具有高度的保守性,因此可推测 PmCRT 与甾体激素的卵巢发育调控具有相关性。本研究通过对 PmCRT 基因的序列分析和表达分析,推测其与斑节对虾甾体激素对卵巢发育调控可能相关,而此推测还需后续实验进一步进行验证。

参考文献:

[1] 徐菲菲,刘秀华. 钙网蛋白的生理及病理生理学作用[J]. 生理科学进展,2006, 37(3):216 -220.

[2] MICHALAK M, BUMS K, ANDRIN C, et al. Endoplasmic reticulum form of calreticulin modulates glucocorticoid-sensitive gene expression[J]. Biological Chemistry, 1996, 271(1): 29436 -29445.

[3] STEVEN J, MAREK M, MICHAL O, et al. The ins and outs of Calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space [J]. Trends in Cell Biology, 2001, 11(3): 122 -129.

[4] BALAKIER H, DZIAK E, SOJECKI A, et al. Calcium-binding proteins and calcium-release channels in human maturing oocytes, pronuclear zygotes and early preimplantation embryos[J]. Human Reproduction, 2002, 17(11): 2938 -2947.

[5] ZHANG D X, LI X P, SUN S C, et al. Involvement of ER-calreticulin-Ca^{2+} signaling in the regulation of porcine oocyte meiotic maturation and maternal gene expression [J]. Molecular Reproduction and Development, 2010, 77(5): 462 -471.

[6] LUANA W, LI F H, WANG B, et al. Molecular characteristics and expression analysis of calreticulin in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 147(3): 482 -491.

[7] KAWABE S, YOKOYAMA Y. Molecular cloning of calnexin and calreticulin in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and its expression in response to air exposure [J]. Marine Genomics, 2010, 3(1): 19 -27.

[8] FAN W M, HU Y L, LI C Z, et al. Cloning, Characterization, and Expression Analysis of Calreticulin from Pearl Oyster *Pinctada fucata* [J]. Tsinghua science and technology, 2008, 13(4): 466 -473.

[9] KENNEDY T E, KUHL D, BARZILAI A, et al. Long-term sensitization training in Aplysia leads to an increase in calreticulin, a major presynaptic calcium-binding protein [J]. Neuron, 1992, 9(6):1013 -1024.

[10] 黄建华,周发林,马之明,等. 南海北部斑节对虾卵巢发育的形态及组织学观察[J]. 热带海洋学报,2006, 25(3): 47 -52.

[11] MICHAEL J S, GORDON L E K. Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein[J]. The EMBO Journal, 1989, 8(12): 3581 -3586.

[12] FAIRSA N J, QUINLANB P T, GOADA L J. Changes in ovarian unconjugated and conjugated steroid titers during vitellogenesis in *Penaeus monodon*[J]. Aquaculture, 1990, 89(1): 83 - 99.

[13] 张成锋,闵宽洪,张汉华,等. 不同发育期克氏原螯虾卵巢和肝胰腺中孕酮和雌二醇含量变化[J]. 上海海洋大学学报,2009,18(1):107 - 110.

Molecular cloning and expression analysis of calreticulin from *Penaeus monodon*

ZHENG Li-ming[1,2], ZHOU Fa-lin[1], YANG Qi-bin[1], HUANG Jian-hua[1], QIU Li-hua[1], SU Tian-feng[1], YANG Li-shi[1], JIANG Shi-gui[1]

(1. *South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou* 510300, *Guangdong, China*; 2. *Animal Sciences Institute, South China Agriculture University, Guangzhou* 510642, *Guangdong, China*)

Abstract: The techniques of Rapid Amplification of cDNA Ends were used to clone the *Penaeus monodon* calreticulin gene (PmCRT). The full length cDNA of PmCRT contained a 5′untranslated region (UTR) of 37 bp, an ORF of 1 221 bp encoding a polypeptide of 406 amino acids with an estimated molecular mass of 46.8 ku and a 3′UTR of 414 bp. Sequence alignment analysis showed that the PmCRT and *Fenneropenaeus chinensis* shared a similarity of 100%, and a homology of 98.8%. The quantification result of PmCRT mRNA in 8 tissues of *Penaeus monodon* showed that, in ovary the highest levels, followed by muscle, intestines, stomach, eyestalk, hepatopancreas, heart and brain. Furthermore, the PmCRT expression was found to be at high level in the six ovarian stages of development and the expression of ovarian growth levels in the third growth phase was significantly higher than that of others, while the lowest in the first growth phase. The study provided essential materials and laid a firm foundation for the further research of the function of PmCRT in ovary development.

Key words: *Penaeus monodon*; calreticulin; clone; expression