

文章编号: 1674 - 5566(2014)05 - 0649 - 07

合浦珠母贝 *Pf-Cnot2* 基因的克隆与表达分布

王雨亭, 徐广锐, 梁 健, 谢 军, 谢莉萍, 张荣庆

(清华大学生命科学学院 海洋生物技术研究所, 北京 100084)

摘 要: 采用 RACE 技术从合浦珠母贝外套膜组织中克隆得到了 CCR4-NOT 复合体第二亚基(*Cnot2*) 基因, 命名为 *Pf-Cnot2*。该基因全长 2 616 bp, 开放阅读框为 1 725 bp, 编码 574 个氨基酸, 理论分子量为 61 ku, 理论等电点为 6.25。蛋白序列分析表明它富含丝氨酸、甘氨酸和苏氨酸, 具有保守的 NOT2_3_5 结构域。系统进化分析显示 *Pf-Cnot2* 蛋白与脊椎动物的 *Cnot2* 蛋白进化关系较远。*Pf-Cnot2* 在合浦珠母贝的外套膜边缘、外套膜缘膜、足、生殖腺、内脏团、闭壳肌和鳃等组织中均有表达, 在生殖腺中表达量最高。该基因从担轮幼虫期至幼贝期均有表达, 担轮幼虫期表达量最少, D 型期比担轮幼虫期有显著增高。上述研究结果为进一步了解 *Pf-Cnot2* 在合浦珠母贝中发挥的作用提供了基础数据。

研究亮点: 关于 CCR4-NOT 蛋白复合体在软体动物中的研究很少, 之前未见报道。本文首次在合浦珠母贝中克隆了其第二亚基 *Cnot2* 的基因全长, 并研究了该基因在合浦珠母贝中不同组织和不同发育时期的表达情况, 为探究 CCR4-NOT 蛋白复合体在软体动物中的作用奠定了基础。

关键词: 合浦珠母贝; *Cnot2*; 基因克隆; 表达

中图分类号: S 917

文献标志码: A

CCR4-NOT (carbon catabolite repression, negative on TATA-less) 复合体是真核细胞中主要的去腺苷化酶, 从酵母到人类, 其进化高度保守^[1-4]。该复合体主要是在 mRNA 降解过程的第一步发挥去腺苷化作用^[5-6], 同时还参与调节 mRNA 的输出、转录、翻译和蛋白降解等过程^[1,4]。CCR4-NOT 复合体至少由 9 个亚基组成^[7-8], 第二个亚基 *Cnot2* 对于维持该复合体的稳定性和发挥其功能至关重要^[9-10]。*Cnot2* 能抑制 RNA 聚合酶 II 的启动子活性, 影响 mRNA 的合成, 其发挥主要抑制功能的模序是 Not-Box^[11]。综上, *Cnot2* 通过影响 CCR4-NOT 复合体的稳定性和 RNA 聚合酶 II 的启动子活性, 调节体内 mRNA 代谢过程, 进而调控生物体的生理活动。

合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 是目前我国主要的海水珍珠养殖品种^[12]。贝壳和珍珠是在外套膜组织所分泌的基质蛋白的调控下, 由碳酸钙晶体有序沉积而成^[13]。合浦珠母贝的发育时期

可分为受精卵、担轮幼虫期、D 型期、附着期、幼贝期、成体贝期等^[14-15], 其中 D 型期时, 贝壳开始生长^[16]。目前软体动物中关于 *Cnot2* 基因的研究鲜有报道, 为更好地了解 CCR4-NOT 蛋白在软体动物中起到的作用, 本研究根据实验室前期所获得的不同发育时期抑制消减杂交文库信息, 利用 RACE 方法克隆得到了合浦珠母贝 *Pf-Cnot2* cDNA 全长序列, 并探讨了该基因在合浦珠母贝不同组织和不同发育时期的表达水平。

1 材料与方法

1.1 材料

合浦珠母贝取自广东省湛江市广东海洋大学珍珠贝养殖场, 取健康、活力好的二龄成体贝 6 只, 解剖后取外套膜边缘、外套膜缘膜、足、闭壳肌、内脏团、生殖腺和鳃等组织, 液氮冷冻保存。不同发育时期样品取自广西壮族自治区北海市珍珠贝养殖场, 取 30 只二龄健康亲贝 (雌 18 只,

收稿日期: 2014-04-11 修回日期: 2014-05-09

基金项目: 教育部自主科研计划(20111080964)

作者简介: 王雨亭(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物学。E-mail: wyt_2014@163.com

通信作者: 张荣庆, E-mail: rqzhang@mail.tsinghua.edu.cn

雄 12 只)置于尼龙袋中,阴干 2~3 h 后吊养于养殖池中,排精、卵后 8~10 h 收集担轮幼虫 5 mL, 16~20 h 收集 D 型期幼虫 5 mL, 10 d 左右收集附着板上的附着期幼虫 5 mL, 30 d 左右取幼贝 10 只,分别置于 RNAlater 中混匀,4 °C 过夜并保存。

1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

取保存的合浦珠母贝外套膜组织,加液氮,充分研磨,Trizol 法提取总 RNA。通过甲醛变性电泳和紫外分光光度计检验所获得的 RNA 的完整性和浓度。取外套膜组织总 RNA 样品 1 µg(1 µg/µL),按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)操作手册,分别合成外套膜组织的 5'-RACE-ready cDNA 和 3'-RACE-ready cDNA。

1.3 *Pf-Cnot2* 基因的克隆

以合成的 5'-RACE-Ready cDNA 和 3'-RACE-

Ready cDNA 为模板,分别进行 5' RACE 和 3' RACE 反应。在 5' RACE 反应中,以 5'-Cnot2 引物和 UPM 通用引物为第一轮 PCR 引物,以 5'-NCnot2 和 NUP 通用引物为第二轮 PCR 引物。在 3' RACE 反应中,以 3'-Cnot2 引物和 UPM 通用引物为第一轮 PCR 引物,以 3'-NCnot2 和 NUP 通用引物为第二轮 PCR 引物(表 1)。PCR 反应程序按照 Clontech 说明书进行。PCR 产物经电泳、胶回收、连接、转化后,通过菌落 PCR 选取阳性克隆送测序。

根据 5' RACE 和 3' RACE 所得到的序列信息,用引物 Cnot2-F 和 Cnot2-R(表 1)进行 PCR 反应,产物经胶回收、连接、转化、测序,确认 *Pf-Cnot2* 全长序列信息。

表 1 实验中所使用的引物
Tab.1 The primers used in this study

RACE-PCR 引物	引物用途	序列(5'-3')
5'-Cnot2	5' RACE	CGCGCAGCAGCTAGTTGTATGACATCAC
5'-NCnot2	5' RACE	GCCAGGGCTACCAAGCTAGGCTCAAACCT
3'-Cnot2	3' RACE	ACACCAACCAGTAGTGCCTCAAACACCT
3'-NCnot2	3' RACE	TCATACAACCTAGCTGCTGCCGACAGAACT
Cnot2-F	cDNA 全长验证	GGACAACAGAGACCAAAGAAAACCGG
Cnot2-R	cDNA 全长验证	ATGGTAGTGTGAACTGCCCTCCCTC
qCnot2-F	目的基因定量	CTATTTACGGTCTCAGTTC
qCnot2-R	目的基因定量	GATATTTCTGTTAGGGGAAG
GAPDH-F	内参基因定量	GCCGACTATGTGGTAGAATC
GAPDH-R	内参基因定量	CACTGTTTTCTGGGTAGCTC
18S rRNA-F	内参基因定量	TGCTGCCCTATCAACTTTC
18S rRNA-R	内参基因定量	GATGTGGTAGCCGTTTCTCA

1.4 基因的序列分析

用 BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 搜索同源基因;应用 Translate 软件 (<http://web.expasy.org/translate/>) 查找开放阅读框并预测蛋白序列;用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测编码蛋白的理化特性;用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽序列;使用 Pfam 软件 (<http://pfam.sanger.ac.uk/search/sequence>) 分析蛋白氨基酸序列的保守域;采用 Clustal Ω 软件对氨基酸序列进行比对,同时使用序列处理在线工具包 (<http://www.bio-soft.net/sms/index.html>) 进行绘图;使用 MEGA 6.0 软件的邻位相连法(Neighbor-joining, NJ)绘制系统进化树。运用 SPSS 13.0 软件和 Prism 6.0 软件进行数据统计

和差异显著性分析并作图, $P < 0.05$ 表示差异显著。

1.5 基因的组织分布和不同发育时期的表达

采用 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) 试剂盒,将合浦珠母贝不同组织(外套膜边缘、外套膜缘膜、足、生殖腺、内脏团、闭壳肌、鳃)及不同发育时期(担轮幼虫期、D 型期、附着期、幼贝期)的总 RNA 反转录合成 cDNA 模板。

以 qCnot2-F 和 qCnot2-R(表 1)为目的基因引物、GAPDH-F 和 GAPDH-R 为内参基因引物,进行 *Pf-Cnot2* mRNA 在合浦珠母贝不同组织的表达分析。以 qCnot2-F 和 qCnot2-R 为目的基因引物、18S rRNA-F 和 18S rRNA-R 为内参基因引物^[16],进行 *Pf-Cnot2* mRNA 在合浦珠母贝不同发

育时期的表达分析。具体方法如下:运用 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒进行实时定量 PCR,反应在 ABI step one plus 仪器上进行,程序为:95 °C 30 s,95 °C 5 s,60 °C 30 s,40 个循环,每个样品做 3 个重复,采用相对 CT 法(2^{-ΔΔCT}法)进行表达量比较。

2 结果与分析

2.1 序列分析

以 Cnot2-F 和 Cnot2-R 为引物,确认得到了 2 616 bp 的 *Pf-Cnot2* cDNA 的全长序列(图 1),

GenBank 登录号为 KJ627803。全长序列中 5'-UTR 424 bp,开放阅读框 1 725 bp,3'-UTR 467 bp。3'-UTR 中包含典型的加尾信号序列 AATAA 和 20 个碱基的 poly(A)尾。开放阅读框共编码 574 个氨基酸,推测其理论分子量为 61 ku,理论等电点为 6.25。氨基酸组成分析表明,*Pf-Cnot2* 蛋白含量较多的 3 种氨基酸残基为 Ser(15.5%)、Gly(11.0%)和 Thr(9.1%)。Pfam 软件预测该编码蛋白含有一段保守的 NOT2_3_5(NOT2 / NOT3 / NOT5)结构域。SignalP 4.1 预测显示该蛋白不存在信号肽。

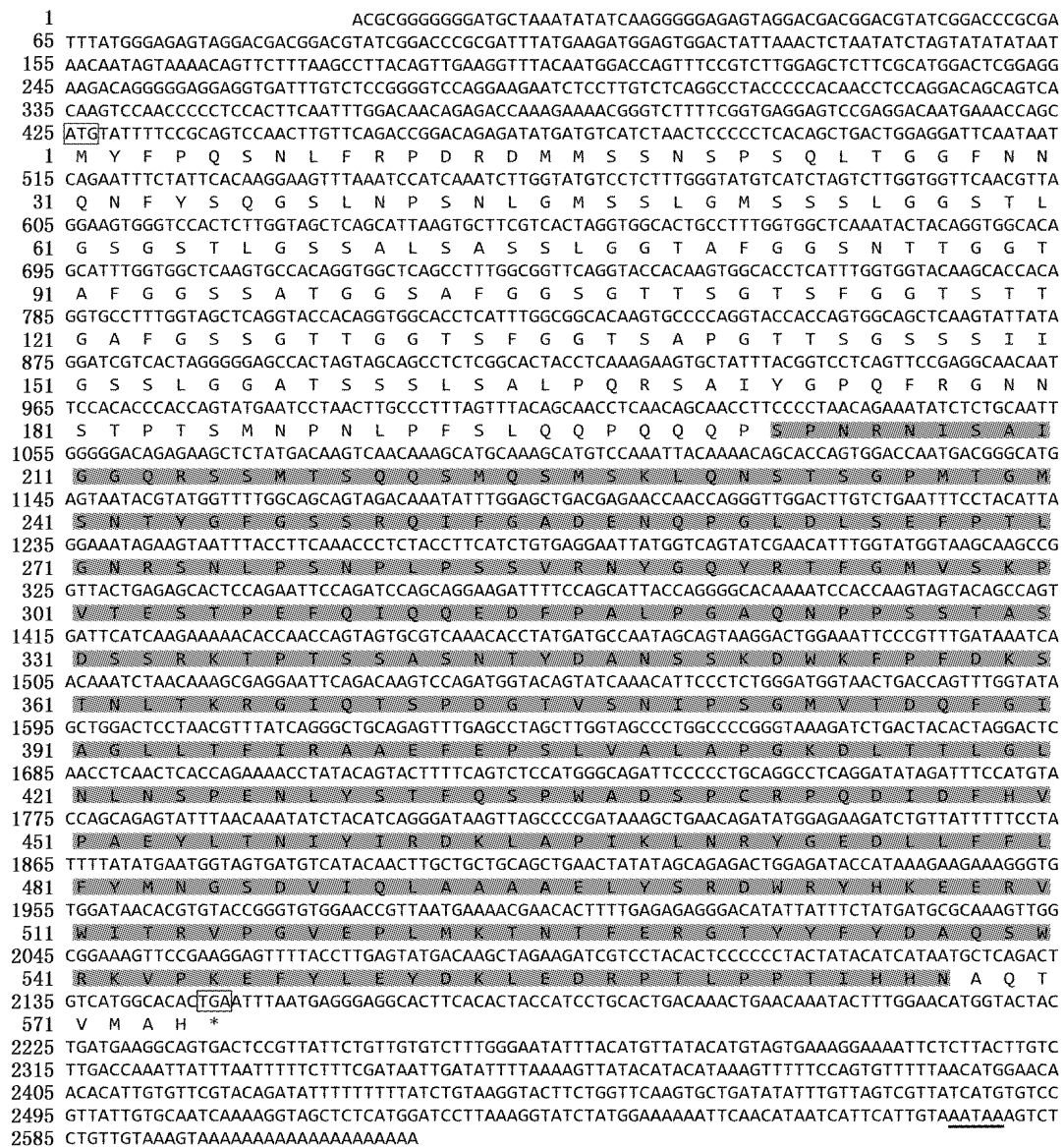


图 1 合浦珠母贝 *Pf-Cnot2* 的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and predicted amino acid sequences of *Pf-Cnot2* from *Pinctada fucata*

图中加框的所对应的密码子为基因的起始密码子和终止子; * 表示蛋白翻译结束;阴影表示同源性高的蛋白质序列;下划线为加尾信号 AATAA。

2.2 同源性比较和系统发生分析

氨基酸序列比对显示, Pf-Cnot2 与 Dr-Cnot2 同源性为 58%, 相对较高(图 2)。Pf-Cnot2 的第 202 位至 567 位之间的氨基酸残基与其他物种的 Cnot2 蛋白相比, 具有高度保守性。

系统进化树分析显示, Pf-Cnot2 单独在一个分支, 而其他 Cnot2 则位于另一个分支, 这表明软体动物与脊椎动物的 Cnot2 遗传距离较远(图 3)。同时, 脊椎动物中不同纲之间的 Cnot2 遗传距离较远, 而同一个纲之间的遗传距离很近。

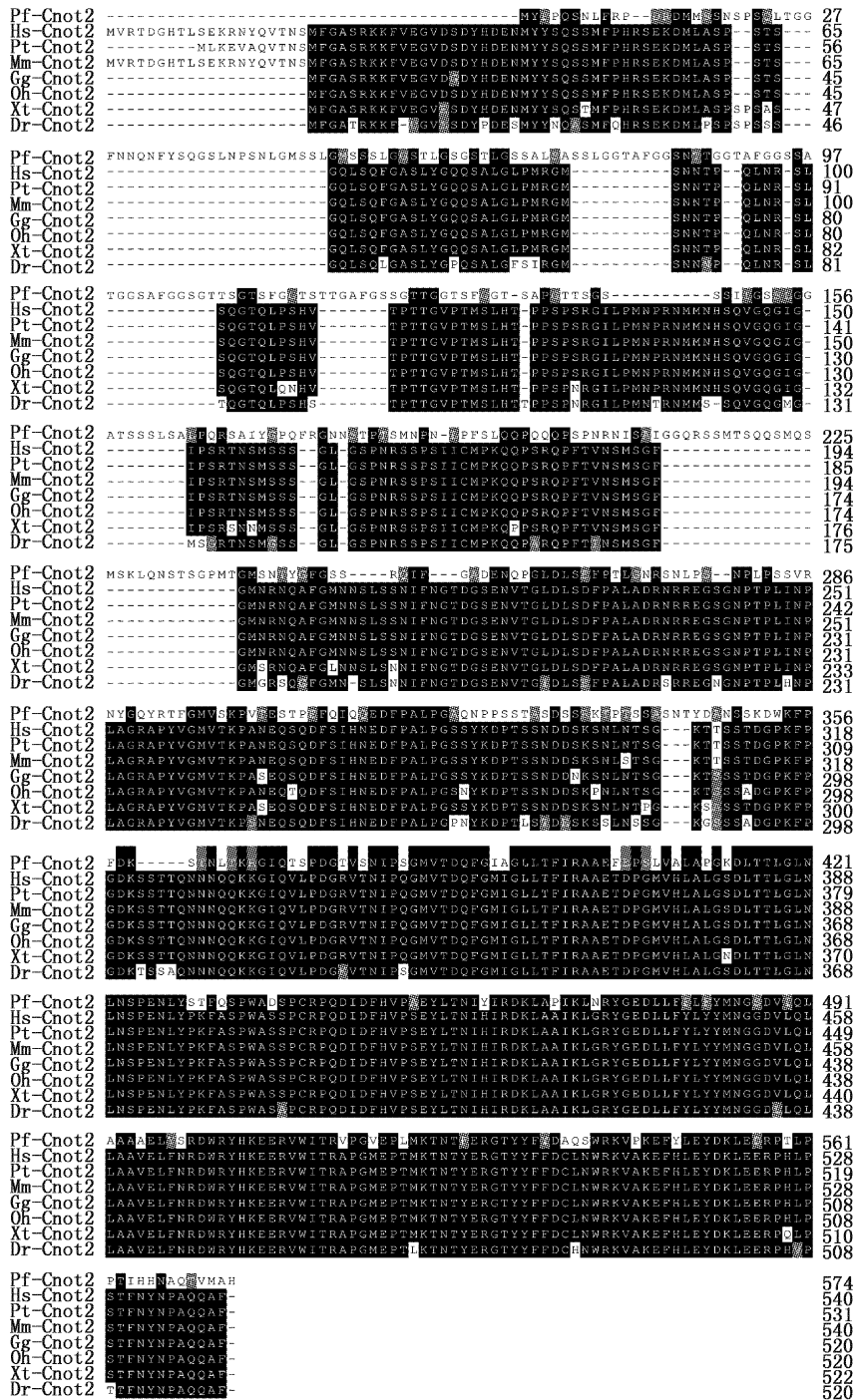


图 2 合浦珠母贝 Pf-Cnot2 与其他物种 Cnot2 蛋白氨基酸序列比对

Fig. 2 Multiple alignment of the predicted amino acid sequence of Pf-Cnot2 with Cnot2 in other species

黑色阴影表示完全相同的氨基酸, 灰色阴影表示理化性质相同的氨基酸, Pf. 合浦珠母贝, KJ627803; Hs. 人, NP_001186232.1; Pt. 黑猩猩, NP_001267421.1; Mm. 小鼠, AAH65171.1; Gg. 鸡, NP_001012826.1; Oh. 眼镜王蛇, ETE61752.1; Xt. 热带爪哇蛙, NP_001106600.1; Dr. 斑马鱼, NP_001082993.1。

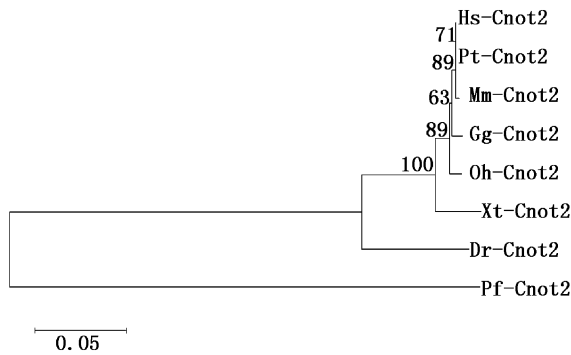


图3 合浦珠母贝 *Pf-Cnot2* 蛋白与其他物种的 *Cnot2* 蛋白的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of *Pf-Cnot2* and *Cnot2* in other species

涉及物种参见图2注释。

2.3 *Pf-Cnot2* 在合浦珠母贝不同组织和发育时期的表达分析

以 *GAPDH* 基因为参照,检测了 *Pf-Cnot2* 在

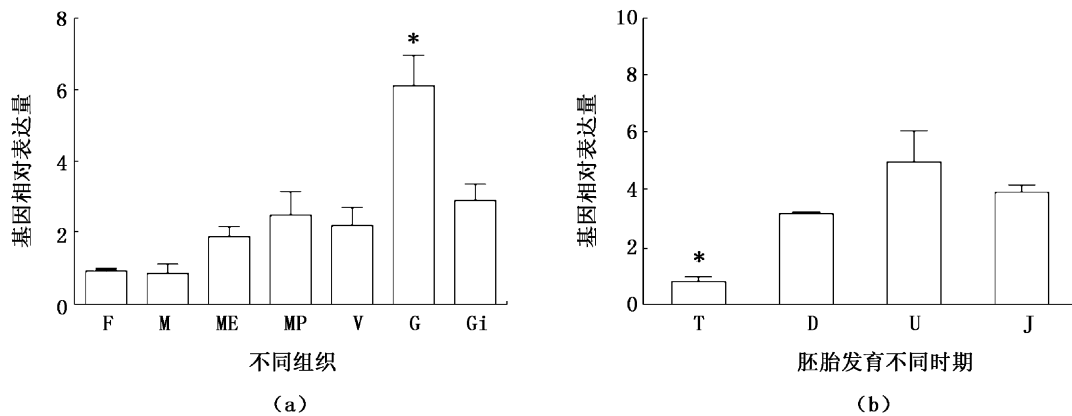


图4 合浦珠母贝 *Pf-Cnot2* 在不同组织 (a) 和发育时期 (b) 的表达情况

Fig.4 The expression of *Pf-Cnot2* in different tissues (a)

and at different developmental stages (b) of *Pinctada fucata*

F. 足; M. 闭壳肌; ME. 外套膜边缘; MP. 外套膜缘膜; V. 内脏团; G. 生殖腺; Gi. 鳃; T. 担轮幼虫期; D. D型期; U. 附着期; J. 幼贝期。*表示其与其他组织或时期相比具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

Pf-Cnot2 基因的片段信息是我们从 D 型期消减担轮幼虫期的杂交文库中得到的,由此我们设计引物进行了基因的克隆并得到了全长序列。氨基酸序列分析表明,该序列的 C 端自第 382 位氨基酸开始,与其他物种的 *Cnot2* 蛋白的 C 端具有高度同源性,尤其是第 428 位至 555 位氨基酸,属于典型的 NOT2_3_5 结构域。同时,第 471 位至 557 位氨基酸为保守的 Not-Box 模序^[11]。从进化关系上,在 NCBI 蛋白库中搜索,已发现近 90

个物种的 *Cnot2* 蛋白,但其中还未有软体动物的 *Cnot2* 蛋白序列。*Pf-Cnot2* 在系统进化树上单独为一支,而与脊椎动物 *Cnot2* 差别较大,证明其与物种进化的一致性。

合浦珠母贝不同组织的表达情况。实验结果如图 4(a) 所示,*Pf-Cnot2* 在合浦珠母贝的足、闭壳肌、外套膜边缘、外套膜缘膜、内脏团、生殖腺和鳃等组织中均有分布,在生殖腺中相对表达量最高,鳃与外套膜缘膜次之,足和闭壳肌最少。在生殖腺中的表达量与其他组织相比,具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

以 18S rRNA 基因为参照,检测了 *Pf-Cnot2* 在不同发育时期的表达情况。实验结果如图 4(b) 所示,*Pf-Cnot2* 在各时期也均有表达,其中附着期的相对表达量最高,D 型期和幼贝期次之,担轮幼虫期表达量最少。担轮幼虫期表达量与其他时期相比,具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

个物种的 *Cnot2* 蛋白,但其中还未有软体动物的 *Cnot2* 蛋白序列。*Pf-Cnot2* 在系统进化树上单独为一支,而与脊椎动物 *Cnot2* 差别较大,证明其与物种进化的一致性。

合浦珠母贝成体不同组织中 *GAPDH* 基因表达相对稳定,所以我们选择其作为内参基因研究了 *Pf-Cnot2* 在合浦珠母贝不同组织中的表达分布^[17]。结果显示,尽管 *Pf-Cnot2* 基因广泛分布于合浦珠母贝体内各个组织,但在生殖腺中表达量最高,鳃和外套膜缘膜次之。在小鼠中,*Cnot2* 在生殖系统——睾丸和卵巢中均有表达,表明

Cnot2 与哺乳动物精子和卵子的形成过程密切相关^[18]。本研究中,*Pf-Cnot2* 在合浦珠母贝生殖腺中表达量最高,表明其与合浦珠母贝精子、卵子的形成过程有相关性,考虑到 *Cnot2* 序列的高度保守性,推测合浦珠母贝生殖腺中的 *Cnot2* 可能发挥着与哺乳动物中相似的作用。鳃是软体动物的呼吸器官,鳃轴与静脉和动脉贯通。鳃是一个从水环境中吸收可溶性离子的界面,离子再通过血液迅速地运输到各个器官。在贝壳的形成过程中,合浦珠母贝需要从海水中吸收 Ca^{2+} , 以完成其生物矿化过程^[19]。有研究者在淡水螺的鳃里检测到了大量的钙沉积物^[20]。钙离子被吸收后,需要储存运输到矿化的直接部位——外套膜,而 *Pf-Cnot2* 在外套膜缘膜中表达量也较高。据此推测,*Pf-Cnot2* 可能在钙的摄入和贝壳的形成过程中发挥重要的调节作用。

因不同发育时期下 *GAPDH* 和 β -*actin* 基因表达水平均有变化,不稳定,所以我们采用了发育时期表达较稳定的 18S rRNA 基因作为内参基因,研究了 *Pf-Cnot2* 在合浦珠母贝不同发育时期的表达^[16]。结果显示,*Pf-Cnot2* 在 D 型期比担轮幼虫期表达量高,且差异显著。D 型期是合浦珠母贝发育过程中最先沉淀晶体的时期^[21],此时贝壳开始生长,诸多基质蛋白表达量增高并发挥作用^[21-22]。而此时 *Pf-Cnot2* 的表达量也升高,作为一个负调控因子^[2,4],很有可能是对高表达的基质蛋白发挥了负调节作用,以实现碳酸钙晶体的有序沉积。当然,合浦珠母贝在 D 型期时的生长也必然涉及众多信号通路的开启和基因转录水平的提高,这可能会伴随着 *Pf-Cnot2* 以及 CCR4-NOT 复合体其他亚基表达水平的增强,以降解冗余的 mRNA。

本研究克隆得到了 *Pf-Cnot2* 基因 cDNA 全长,并进行了生物信息学分析,发现 *Pf-Cnot2* 在生殖腺、鳃和外套膜缘膜组织以及在合浦珠母贝 D 型期中的表达量较高,为进一步研究 *Pf-Cnot2* 在合浦珠母贝中发挥的作用奠定了基础。

参考文献:

- [1] COLLART M A, PANASENKO O O. The Ccr4-not complex [J]. *Gene*, 2012, 492(1): 42 - 53.
- [2] COLLART M A. Global control of gene expression in yeast by the Ccr4-Not complex[J]. *Gene*, 2003, 313: 1 - 16.
- [3] SOLANA J, GAMBERI C, MIHAYLOVA Y, et al. The CCR4-NOT complex mediates deadenylation and degradation of stem cell mRNAs and promotes planarian stem cell differentiation [J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(12): e1004003.
- [4] MILLER J E, REESE J C. Ccr4-Not complex: the control freak of eukaryotic cells [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 47(4): 315 - 333.
- [5] GARNEAU N L, WILUSZ J, WILUSZ C J. The highways and byways of mRNA decay[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8(2): 113 - 126.
- [6] WIEDERHOLD K, PASSMORE L A. Cytoplasmic deadenylation: regulation of mRNA fate [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2010, 38(6): 1531 - 1536.
- [7] COLLART M A, TIMMERS H T. The eukaryotic Ccr4-not complex: a regulatory platform integrating mRNA metabolism with cellular signaling pathways? [J]. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 2003, 77: 289 - 322.
- [8] ASSENHOLT J, MOUAIKEL J, SAGUEZ C, et al. Implication of Ccr4-Not complex function in mRNA quality control in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *RNA*, 2011, 17(10): 1788 - 1794.
- [9] RUSSELL P, BENSON J D, DENIS C L. Characterization of mutations in *NOT2* indicates that it plays an important role in maintaining the integrity of the CCR4-NOT complex [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 322(1): 27 - 39.
- [10] ITO K, INOUE T, YOKOYAMA K, et al. CNOT2 depletion disrupts and inhibits the CCR4-NOT deadenylase complex and induces apoptotic cell death[J]. *Genes to Cells*, 2011, 16(4): 368 - 379.
- [11] ZWARTJES C G M, JAYNE S, VAN DEN BERG D L C, et al. Repression of promoter activity by CNOT2, a subunit of the transcription regulatory Ccr4-not complex [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(12): 10848 - 10854.
- [12] 和田浩而. 珍珠的科学[M]. 东京: 珍珠新闻社, 1999.
- [13] MARIN F, LUQUET G, MARIE B, et al. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution [J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2007, 80: 209 - 276.
- [14] FUJIMURA T, WADA K, IWAKI T. Development and morphology of the pearl oyster larvae, *Pinctada fucata* [J]. *Venus the Japanese Journal of Malacology*, 1995, 54(1): 25 - 48.
- [15] 小林新二郎, 渡部哲光. 珍珠的研究[M]. 熊大仁, 译. 北京: 农业出版社, 1966.
- [16] MIYAZAKI Y, NISHIDA T, AOKI H, et al. Expression of genes responsible for biomineralization of *Pinctada fucata* during development [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 155(3): 241 - 248.
- [17] LI C, HUANG J, LI S, et al. Cloning, characterization and immunolocalization of two subunits of calcineurin from pearl

- oyster (Pinctada fucata)*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 153(1): 43–53.
- [18] CHEN C, ITO K, TAKAHASHI A, et al. Distinct expression patterns of the subunits of the CCR4-NOT deadenylase complex during neural development[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 411(2): 360–364.
- [19] ROUSSEAU M, PEREIRA-MOURIÈS L, ALMEIDA M J, et al. The water-soluble matrix fraction from the nacre of *Pinctada maxima* produces earlier mineralization of MC3T3-E1 mouse pre-osteoblasts[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 135(1): 1–7.
- [20] PYNNÖNEN K, HOLWERDA D A, ZANDEE D I. Occurrence of calcium concretions in various tissues of freshwater mussels, and their capacity for cadmium sequestration[J]. *Aquatic Toxicology*, 1987, 10(2): 101–114.
- [21] FANG D, XU G, HU Y, et al. Identification of genes directly involved in shell formation and their functions in pearl oyster, *Pinctada fucata*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21860.
- [22] FANG D, PAN C, LIN H, et al. Novel basic protein, PfN23, functions as key macromolecule during nacre formation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(19): 15776–15785.

Cloning and expression of *Pf-Cnot2* in *Pinctada fucata*

WANG Yu-ting, XU Guang-ruì, LIANG Jian, XIE Jun, XIE Li-ping, ZHANG Rong-qing
(*Institute of Marine Biotechnology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China*)

Abstract: *Cnot2*, a subunit of CCR4-NOT, was cloned from the mantle tissue of *Pinctada fucata* by RACE PCR and named *Pf-Cnot2*. The complete sequence was 2 616 bp long and the open reading frame was 1 725 bp, which encoded 574 amino acid residues with the theoretical molecular weight of 61 ku and theoretical isoelectric point of 6.25. Protein sequence analysis showed that it was rich in serine, glycine and threonine, and had a conservative NOT2_3_5 domain. Phylogenetic analysis indicated that *Pf-Cnot2* had a far evolutionary relationship with *Cnot2* of vertebrates. This gene was expressed in tissues of mantle edge, mantle pallial, foot, gonad, visceral mass, adductor muscle and gill in *Pinctada fucata*, in which, gonad had the highest expression level, followed by gill and mantle pallial. *Pf-Cnot2* was expressed during the whole process since trochophore developed into the juvenile shell, and got to its lowest level at trochophore stage. D-shape stage was significantly higher than trochophore stage. The results above provided basic materials for further study of the role that *Pf-Cnot2* played in *Pinctada fucata*.

Key words: *Pinctada fucata*; *Cnot2*; gene cloning; expression