

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.16.001

• 基础研究 •

合浦珠母贝 *PU3* 基因的克隆及功能鉴定 *姜晓凡¹ 刘阳嘉¹ 刘 闯¹ 谢莉萍¹ 张荣庆^{1,2Δ}

(1 清华大学生命科学学院 北京 100084; 2 清华长三角研究院生物技术与医药研究所 浙江 嘉兴 314006)

摘要 目的:克隆获得合浦珠母贝 *PU3* 基因的序列,并研究其在生物矿化中的功能。**方法:**使用 RACE 获得 *PU3* 基因的全长;利用实时荧光定量 PCR 的方法检测 *PU3* 基因在不同组织中的表达分布;利用实时荧光定量 PCR 的方法检测贝壳损伤修复过程中 *PU3* 基因的表达量的变化;通过 RNAi 实验,抑制 *PU3* 基因的表达,之后用扫描电子显微镜观察合浦珠母贝贝壳表面的变化。**结果:**合浦珠母贝 *PU3* 基因的 cDNA 全长为 2361bp,编码 618 个氨基酸。氨基酸序列的功能结构域分析表明其含有 4 个 FN3 结构域。该基因在外套膜中高表达,且在外套膜边缘区的表达量高于外套膜中心区。在贝壳损伤修复的过程中,该基因的表达水平呈现上升的趋势。利用 RNAi 技术抑制 *PU3* 基因的表达后,贝壳的棱柱层结构发生了变化,缝隙变宽,且出现空洞。**结论:***PU3* 基因所表达的蛋白作为正调控因子参与生物矿化的过程,并主要作用于贝壳的棱柱层,抑制其表达会影响棱柱层的框架结构。

关键词:合浦珠母贝;生物矿化;FN3 结构域

中图分类号:R-33;Q786;Q959.223 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)16-3001-05

Cloning and Characterization of *PU3* from the Oyster *Pinctada fucata* *JIANG Xiao-fan¹, LIU Yang-jia¹, LIU Chuang¹, XIE Li-ping¹, ZHANG Rong-qing^{1,2Δ}

(1 School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China;

2 Biotechnology and Pharmaceutical Research, Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Jiaxing, Zhejiang, 314006, China)

ABSTRACT Objective: To obtain the sequence of *PU3* gene from the oyster *Pinctada fucata* and study the function in biomineralization. **Methods:** The full length of *PU3* gene was obtained by RACE. The expression levels of *PU3* gene in different tissues were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The expression of *PU3* gene through the shell notching experiment was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. RNAi experiments was used to inhibit the expression of *PU3* gene, and then the change in the surface of the shell of was observed by the scanning electron microscope. **Results:** The full-length cDNA of *PU3* gene from *Pinctada fucata* is 2361 bp, encoding 618 amino acids. Functional domain analysis indicated that it contained four FN3 domains. *PU3* is highly expressed in the mantle membrane, especially in the edge of mantle membrane. In the process of shell repairing, the expression level of *PU3* gene showed an increasing trend. After using RNAi technology to inhibit the expression of *PU3* gene, the prismatic layer of the shell has changed, the gaps became wider, and voids appeared. **Conclusions:** It is speculated that *PU3* gene acts as a positive regulator in the process of biomineralization, and mainly influences the prismatic layer of the shell. Inhibiting its expression will affect the framework structure of the prism layer.

Key words: *Pinctada fucata*; Biomineralization; FN3 domain

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q786; Q959.223 **Document code:**A

Article ID: 1673-6273(2019)16-3001-05

前言

生物矿化是自然界中广泛存在的一种自然现象,矿化产物以各种形态发挥着不同的作用,如支撑保护、平衡、感应磁场等。贝壳就是一种经典的生物矿化产物,有着独特的微观结构和优异的机械性能^[1]。合浦珠母贝是我国培育海水珍珠的主要贝种,其贝壳是由 95%以上的碳酸钙和不足 5%的有机成分组成,这不足 5%的有机基质通过调控碳酸钙晶体的生长、晶型及排列方式,在贝壳的形成中发挥着重要的作用^[2]。此前的研究发

现了多种基质蛋白包括 Nacrein、Prisilkin39、Pearlin、KRMP 等,它们在贝壳矿化过程中发挥了重要作用^[3-6]。2015 年,本实验室通过对合浦珠母贝贝壳蛋白组学的分析,发现了一系列未知的具有潜在功能的基质蛋白,其中包括了一些具有 FN3 结构域的蛋白^[7]。

纤连蛋白 III 型结构域 (Fibronectin type III domain, FN3 domain)是已知的最大也是最常见的蛋白子域,它广泛存在于各种动物蛋白中,例如细胞外基质分子,细胞表面受体,酶,肌蛋白等。它由约 100 个氨基酸组成,包含一段可以与 DNA、肝

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31872543,31372502,31502139,31572594)

作者简介:姜晓凡(1994-),硕士研究生,主要研究方向:生物矿化,E-mail: gintlefana@163.com

Δ 通讯作者:张荣庆,博士生导师,教授,主要研究方向:生物矿化,E-mail: rqzhang@mail.tsinghua.edu.cn,电话:010-62772630

(收稿日期:2019-04-09 接受日期:2019-05-05)

素和细胞表面结合的随机重复序列^[9]。其二级结构包含一个保守的 β -sandwich 结构,一个由四个 strand 组成的 β -sheet,一个由三个 strand 组成的 β -sheet^[9]。在合浦珠母贝、黑蝶珍珠贝、牡蛎、贻贝和珊瑚中都发现了含有该结构域的基质蛋白,暗示了该类蛋白在生物矿化中的潜在作用^[10-13]。

本研究工作聚焦于在合浦珠母贝贝壳中发现的一个包含 FN3 结构域的蛋白, *PU3*。本研究通过 RACE 技术克隆该基因的序列,并检测其在合浦珠母贝不同组织中的表达分布及贝壳损伤后修复过程中该基因的表达水平变化,随后分析了该基因表达的蛋白对于贝壳表面结晶的影响。通过以上实验,我们初步探究了 *PU3* 蛋白在贝壳的矿化过程中所发挥的调控贝壳棱柱层矿化的框架结构的作用。本次研究的结果丰富了关于合浦珠母贝矿化过程的认识,为阐明合浦珠母贝贝壳的形成机理奠定一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用的合浦珠母贝采购于广东省湛江市水产养殖场,在实验室内培养在 3‰ 人工海水中,培养温度为 17~19 ℃。

1.2 方法

1.2.1 合浦珠母贝总 RNA 提取 使用 TRIzol 法 (Invitrogen, 美国)提取合浦珠母贝外套膜组织的总 RNA,利用 Nanodrop2000™ (ThermoFisher, 美国)检测所提 RNA 的浓度与质量。

1.2.2 RACE 实验克隆基因全长 使用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification kit (TAKARA)反转录所提总 RNA,得到 RACE 的模板。根据此前合浦珠母贝蛋白组学研究中得到的序列设计 5' 引物和 3' 引物,分别进行 5'-RACE 和 3'-RACE,将得到的结果拼接。最后,用高保真酶 Phusion(NEB)和验证引物 con-F、con-R 进行扩增,获得 *PU3* 的全长基因序列。实验中使用的引物见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 The primer sequences used in PCR

Primer	Sequence
5' RACE-1	GGGTAAGAAAGCCAATGCCATCGCTG
5' RACE-2	CGAGGAATCAGGCCCGGTAACACTACG
3' RACE-1	ATTCGGTGGTTGCCATGACAGCTGG
3' RACE-2	CTCCCCATGCCGAGCCTCTTCATAG
Confirm-F	CCCAAGGAGCACAATTTCACAAG
Confirm-R	GCTACACGATGTCAATGTTCCAGC
RNAi-F	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAAG-GCCACGTTGTACTACTTCCA
RNAi-R	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAAG-GTGACAGCAGATAGCTTGAA
GAPDH-F	GCCGAGTATGTGGTAGAATC
GAPDH-R	CACTGTTTTCTGGGTAGCTG
RT-F	GATGAGTATGGGCAACCTAAAG
RT-R	CAGATTCAACAGACAGGCACTG

1.2.3 基因序列分析 利用多种在线软件对 *PU3* 基因进行序列分析,包括开放阅读框的预测 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)、保守结构域的预测 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)、蛋白二级结构预测 (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/)、蛋白的理论相对分子质量以及理论等电点的预测 (https://web.expasy.org/compute_pi/)等。

1.2.4 组织分布检测 取合浦珠母贝的外套膜缘膜区、外套膜中心区、鳃、闭壳肌、足、心脏、内脏团、生殖腺八个组织,分别提取 RNA,利用 Realtime PCR 的方法检测八种组织中 *PU3* 基因的相对表达量。具体操作为,用 1.2.1 中方法提取 RNA,使用 PrimeScript™ RT Master Mix Perfect Real Time (TAKARA)对 RNA 进行反转录,使用实时荧光定量 PCR 仪 LightCycler480 (Roche, 瑞士)进行检测。本实验选择 *GAPDH* 作为内参基因^[14],基因相对表达量的计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[15]。实验中使用的引物见表 1(GAPDH-F, GAPDH-R, RT-F, RT-R)。

1.2.5 贝壳损伤修复实验 取 40 只生长状况良好,大小相近的贝,分成 8 组,每组 5 只。在其边缘剪一深达珍珠层的缺口,放回人工海水中培养。在 0、6、12、24、36、48、72、96 小时后收集合浦珠母贝外套膜样品,提取 RNA,并利用 Realtime PCR 的方法检测八个时间点时 *PU3* 基因的相对表达量。具体步骤同 1.2.4。

1.2.6 RNAi 实验 使用 RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems (Promega) 来合成双链 RNA,使用的引物见表 1 (RNAi-F, RNAi-R)。取 20 只生长状况良好,大小相近的贝,分为 4 组,每组 5 只。其中,空白对照组注射 200 μ L 的无酶水,阴性对照组注射 80 μ g dsRNA-GFP/200 μ L 无酶水,实验组分别注射 40 μ g dsRNA-*PU3*/200 μ L 无酶水和 80 μ g dsRNA-*PU3*/200 μ L 无酶水。6 天后,收集合浦珠母贝外套膜样品,参照 1.2.1 和 1.2.4 进行 RNA 提取和表达水平检测。同时收集贝壳样品,洗净晾干后,使用扫描电子显微镜 FEI Quanta 200(FEI, 美国)观测贝壳内表面的结构。

1.3 统计学分析

本研究采用 SPSS 统计软件进行统计。其中,使用 T-test 检测实验结果是否具有显著性差异,若 *P* 值小于 0.05,则视为显著性差异。

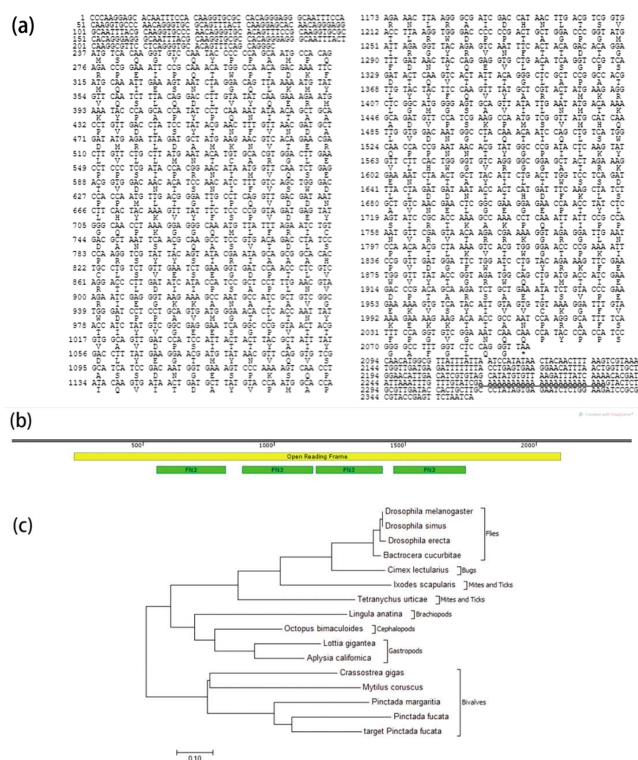
2 结果

2.1 合浦珠母贝 *PU3* 基因的 cDNA 的序列分析

通过 RACE 的方法获得的序列全长见图 1-a。该基因全长为 2361 bp,5' 非编码区长度为 236 bp,3' 非编码区长度为 268 bp,开放阅读框长度为 1857 bp,编码 618 个氨基酸。在线预测结果显示,*PU3* 基因编码的蛋白大小约为 68.73 kDa,理论等电点为 6.53,包含四个 FN3 结构域(图 1-b)。进化树分析显示该基因与太平洋牡蛎、厚壳贻贝、珠母贝中的基质蛋白有较高的相似性,符合了这四者在进化上的亲缘关系(图 1-c)。

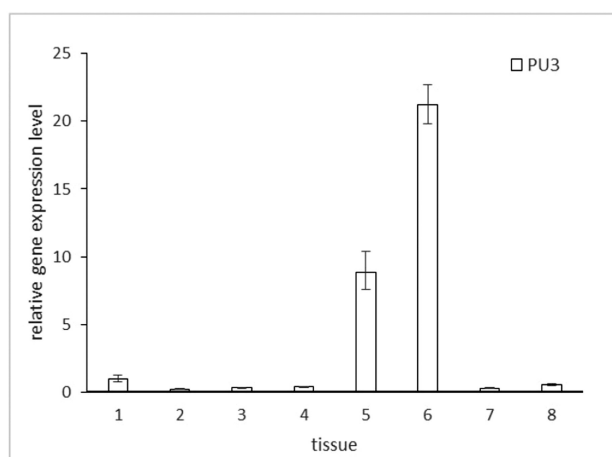
2.2 *PU3* 基因在不同组织中的分布

通过 Realtime PCR 检测了外套膜缘膜区、外套膜中心区、鳃、闭壳肌、足、心脏、内脏团、生殖腺八个组织中 *PU3* 的表达情况。结果显示,*PU3* 在外套膜中的表达量远高于其他组织,其中在外套膜边缘的表达量高于外套膜中心区,达到了外套膜中

图1 *PU3* 基因的全长、结构域分析及进化树分析Fig.1 Full length of *PU3* and analysis of functional domain

- (a) The full length of *PU3* and the transcription of the open reading frame.
(b) The result of conserved domain search. The yellow part was the open reading frame and the green parts were FN3 domain.
(c) The phylogenetic tree of *PU3*, using Mega7.0 and maximum likelihood method.

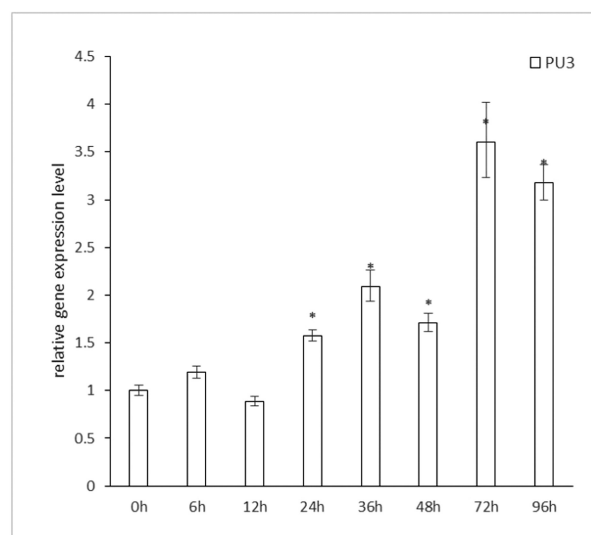
心区表达量的两倍以上(图2)。外套膜是在生物矿化中发挥重要作用的器官,*PU3* 在外套膜边缘的高表达暗示着它在合浦珠母贝的矿化过程中起着一定的作用,并可能更多的影响着棱柱层的形成。

图2 *PU3* 基因在不同组织中的分布Fig.2 The distribution of *PU3* in different tissues

1 to 8 refer to foot, adductor muscle, gonads, visceral mass, the center of mantle, the edge of mantle, heart, gills. Clearly, *PU3* is highly expressed in mantle membrane.

2.3 贝壳修复过程中 *PU3* 基因的表达变化

在受到损伤后,合浦珠母贝会启动修复程序,在伤口处产生矿化产物,修补贝壳。在修复过程中,矿化相关蛋白的表达量会发生变化。本研究检测了修复过程中8个时间点 *PU3* 的表达水平。结果显示,与对照组(损伤后0小时)相比,*PU3* 的表达量在最开始的12小时没有明显变化,之后开始增长。损伤后72小时,*PU3* 的表达量达到峰值,并且在96小时仍处于高位(图3)。这样的结果显示,*PU3* 响应了贝壳修复过程,并且表达水平呈现上调的趋势,暗示了其对于贝壳修复有着促进的作用。

图3 *PU3* 在贝壳修复过程中的表达量的变化Fig.3 The expression of *PU3* during the shell repairing progress

After the injury, the expression level of *PU3* maintained at normal level for 12 hours, and started to increase. The expression level reached the maximum at about 72 h and kept at a high level at 96 h.

(*: significant difference with control group, $P < 0.01$)

2.4 抑制 *PU3* 的表达会影响贝壳矿化

为了更好的探究 *PU3* 在矿化中的功能,本研究进行了RNAi实验。通过将双链RNA注射到合浦珠母贝的闭壳肌里来单一地抑制 *PU3* 的表达。通过Realtime PCR的检测显示,相对于空白对照组(仅注射200 μ L无酶水)和阴性对照组(注射了80 μ g dsRNA-GFP/200 μ L无酶水),实验组中 *PU3* 的表达量确实得到了抑制。注射40 μ g dsRNA-*PU3*/200 μ L无酶水和80 μ g dsRNA-*PU3*/200 μ L无酶水分别将 *PU3* 的表达水平抑制到了空白对照组的70%和20%(图4)。这样的结果显示 *PU3* 基因被成功的抑制了,且其抑制水平和注射的双链RNA的剂量有关。

利用扫描电镜来观察贝壳的表面结构(图5)。与空白对照组相比,阴性对照组的棱柱层结构和珍珠层结构都未见显著变化。注射40 μ g *PU3* 双链RNA的实验组中,棱柱层仍显示棱柱结构,但是边缘已经变得粗糙,不再平滑。在注射80 μ g *PU3* 双链RNA的实验组中,棱柱层的结构变化更加明显,棱柱的结构不再完整。不仅仅边缘变得粗糙,空隙变大,棱柱层中间也出现了空洞。珍珠层并没有像棱柱层一样受到严重的干扰。这样的结果显示,当抑制 *PU3* 的表达被抑制后,棱柱层的矿化受到影响,排列不再致密并出现空洞。

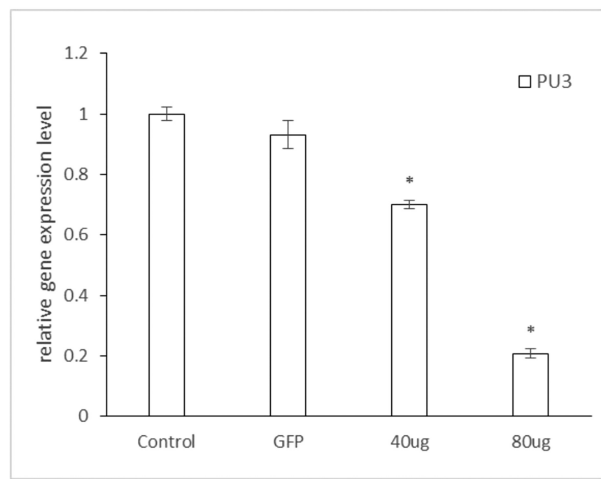


图4 *PU3* 基因在 RNAi 实验中的表达量变化

Fig.4 The expression of *PU3* during the RNAi experiment

The expression level after injecting dsRNA of GFP showed no significant difference from the control group, which only inject water. After injecting dsRNA of *PU3*, the expression level was decreased, and showed dose effect. When injecting 80 μg dsRNA of *PU3*, the expression level was inhibited to 20% of control group. (*: significant difference with control group, $P < 0.01$)

3 讨论

蛋白的结构和功能总是相互对应的。具体到贝壳的基质蛋白上,可以预见基质蛋白为了调控碳酸钙结晶过程,很有可能具有钙离子的结合能力和碳酸酐酶的活性。而在对众多基质蛋白的研究中,也证实了这一点,许多基质蛋白都具有钙离子结合位点或碳酸酐酶结构域,例如 Nacrein、N66 就包含碳酸酐酶结构域^[3,16]。此外,因为有些基质蛋白要和贝壳的几丁质框架相互作用,可能含有几丁质结合域,对 Pi97 和 KRMP 蛋白家族的研究印证了这一点^[17]。但与此同时,基质蛋白里一些其他的共性及常见的结构的功能并没有得到较多的研究,这一点在组学研究出现后显得更加明显。例如,基质蛋白中富含特定氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丝氨酸)的原因,一些新发现的常见结构域(FN3 结构域、LG 结构域、vWA 结构域、酪氨酸酶等)在矿化中的具体功能也有待研究^[18,19]。本研究集中在 FN3 结构域上。FN3 作为构成纤连蛋白的结构域,同纤连蛋白一起,得到了许多的研究。在其他生物体中的研究已经表明, FN3 结构域广泛地参与并介导细胞的黏附与迁移,许多含有 FN3 结构域的蛋白是磷酸化激酶的受体或细胞因子的受体^[20]。在合浦珠母贝、黑蝶珍珠贝、牡蛎、贻贝、珊瑚的基质蛋白中,都发现了一类含有 FN3 结构域的蛋白。一篇太平洋牡蛎的蛋白质组学分析的文章中报道到,一个类纤连蛋白的蛋白在贝壳发育的早期,与几丁质酶一同高表达,并且在成体贝的外套膜中高表达^[10]。但 FN3 结构域的常见功能却较难对应到贝壳矿化的过程中。

因此,本研究获取了合浦珠母贝 *PU3* 基因的 cDNA 全长,并对其在合浦珠母贝贝壳矿化形成中发挥的功能进行了初步的研究。外套膜是软体动物参与矿化过程的主要器官,而 *PU3* 基因在外套膜中的特异性高表达暗示了它在矿化过程中的作用,这也与在太平洋牡蛎中的研究结果相互对应。在通过贝壳

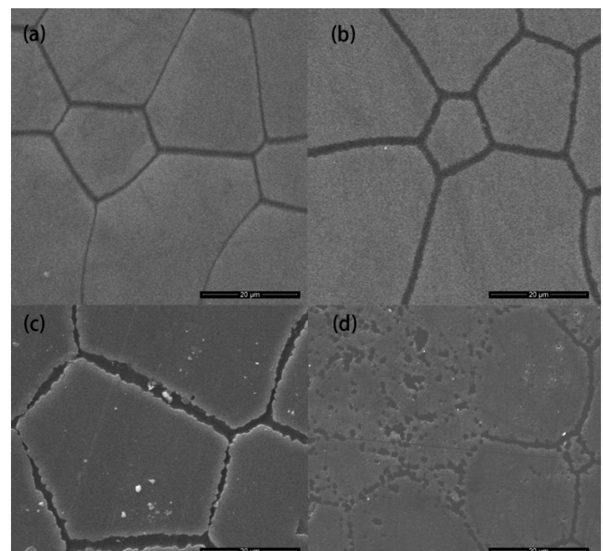


图5 扫描电子显微镜观察贝壳内表面的结构

Fig.5 The structure observation of the shell inner surface by SEM

- (a) group injected with 200 μL of DNase/RNase-free water;
 (b) group injected with 80 μg of GFP-dsRNA diluted in 200 μL of water;
 (c) group injected with 40 μg of *PU3*-dsRNA diluted in 200 μL of water;
 (d) group injected with 80 μg of *PU3*-dsRNA diluted in 200 μL of water

损伤激发贝壳修复的矿化反应后,*PU3* 的表达量升高,表明其对于贝壳矿化过程起着正向的调节作用。并且其表达的变化模式与之前研究过的很多起着正向调控作用的基质蛋白有着较高的相似性,例如 Nacrein、Prisilkin-39。略有不同的是,Nacrein 和 Prisilkin-39 在贝壳损伤 96 小时后,表达量都有了一定程度的回落,并没有保持在高位^[4],而 *PU3* 的表达量则在 96 小时后仍然处于高位。这一情况有两种可能,*PU3* 在矿化过程中可能起到某种长效的作用,或者 *PU3* 受到更为复杂的调控,使得其表达水平并不会非常快速地发生变化。之后,通过 RNAi 实验分析了 *PU3* 在矿化中的作用。当 *PU3* 的表达被抑制后,贝壳的棱柱层不能正常矿化以维持正常的形态。在高浓度的抑制实验中,贝壳棱柱层不仅晶体间边缘变粗糙,缝隙变大,在晶体中间还会出现空洞,难以维持正常的棱柱框架结构。这些现象都可以表明 *PU3* 确实在矿化的过程中发挥了作用,且很大可能是作用于贝壳矿化框架结构。但是 *PU3* 究竟是通过何种机理来参与矿化过程,在这个过程中 FN3 结构域又发挥着怎样的功能,这些问题仍需要进行进一步的实验探究来解答。此外,合浦珠母贝中其他含有 FN3 结构域的基质蛋白是否发挥着和 *PU3* 相似的功能,其他软体动物中含有 FN3 结构域的基质蛋白是否也在矿化过程中发挥着类似的作用,这些问题也值得更加深入的研究和探讨。

综上所述,本课题初步探究了 *PU3* 在贝壳矿化中的功能,推测 *PU3* 有着促进贝壳棱柱层矿化,调控棱柱层矿化框架的功能,为贝壳矿化的机理研究提供了一些理论基础。但是贝壳矿化是一个复杂的过程,许多的基质蛋白和其调控因子参与其中,*PU3* 的作用机理以及与其他基质蛋白的相互作用仍然需要更加深入的研究。

参考文献(References)

- [1] Addadi L, D Joester, F Nudelman, et al. Mollusk shell formation: a

- source of new concepts for understanding biomineralization processes [J]. Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany), 2006, 12(4): 980-987
- [2] Nudelman, F. Nacre biomineralisation: A review on the mechanisms of crystal nucleation [J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2015, 46: 2-10
- [3] Miyamoto H, T Miyashita, M Okushima, et al. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(18): 9657-9660
- [4] Kong YW, G Jing, ZG Yan, et al. Cloning and Characterization of Prisilkin-39, a Novel Matrix Protein Serving a Dual Role in the Prismatic Layer Formation from the Oyster *Pinctada fucata* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(16): 10841-10854
- [5] Miyashita T, R Takagi, M Okushima, et al. Complementary DNA cloning and characterization of pearlins, a new class of matrix protein in the nacreous layer of oyster pearls[J]. Marine Biotechnology, 2000, 2(5): 409-418
- [6] Liang J, G Xu, J Xie, et al. Dual Roles of the Lysine-Rich Matrix Protein (KRMP)-3 in Shell Formation of Pearl Oyster, *Pinctada fucata* [J]. Plos One, 2015, 10(7)
- [7] Liu C, S Li, J Kong, et al. In-depth proteomic analysis of shell matrix proteins of *Pinctada fucata*[J]. Scientific Reports, 2015, 5
- [8] Koide A, CW Bailey, XL Huang, et al. The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins [J]. Journal of Molecular Biology, 1998, 284(4): 1141-1151
- [9] Hytonen VP, B Wehrle-Haller. Protein conformation as a regulator of cell-matrix adhesion[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2014, 16(14): 6342-6357
- [10] Zhang G, X Fang, X Guo, et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation [J]. Nature, 2012, 490(7418): 49-54
- [11] Liao Z, L F Bao, M H Fan, et al. In-depth proteomic analysis of nacre, prism, and myostracum of *Mytilus* shell [J]. Journal of Proteomics, 2015, 122: 26-40
- [12] Marie B, C Joubert, A Tayale, et al. Different secretory repertoires control the biomineralization processes of prism and nacre deposition of the pearl oyster shell [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(51): 20986-20991
- [13] Ramos-Silva P, J Kaandorp, L Huisman, et al. The Skeletal Proteome of the Coral *Acropora millepora*: The Evolution of Calcification by Co-Option and Domain Shuffling [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(9): 2099-2112
- [14] Pan C, D Fang, G Xu, et al. A Novel Acidic Matrix Protein, Pfn44, Stabilizes Magnesium Calcite to Inhibit the Crystallization of Aragonite[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(5): 2776-2787
- [15] Livak K J, T D Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [16] Smith-Keune C, D R Jerry. High levels of intra-specific variation in the NG repeat region of the *Pinctada maxima* N66 organic matrix protein[J]. Aquaculture Research, 2009, 40(9): 1054-1063
- [17] Bahn SY, BH Jo, BH Hwang, et al. Role of Pif97 in Nacre Biomineralization: In Vitro Characterization of Recombinant Pif97 as a Framework Protein for the Association of Organic-Inorganic Layers in Nacre[J]. Crystal Growth & Design, 2015, 15(8): 3666-3673
- [18] Johnstone M B, N V Gohad, EP Falwell, et al. Cellular orchestrated biomineralization of crystalline composites on implant surfaces by the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2015, 463: 8-16
- [19] Marie B, DJ Jackson, P Ramos-Silva, et al. The shell-forming proteome of *Lottia gigantea* reveals both deep conservations and lineage-specific novelties[J]. Febs Journal, 2013, 280(1): 214-232
- [20] Pankov R, K M Yamada. Fibronectin at a glance [J]. Journal of Cell Science, 2002, 115(20): 3861-3863