

香港牡蛎钙调蛋白基因的克隆和组织表达分析

李素萍, 喻达辉, 李应清, 王培, 郭颖, 白丽蓉*

(北部湾大学海洋学院, 广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室, 广西钦州 535011)

摘要 [目的]探究 CaM 在香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)壳钙代谢中的作用及分子机制。[方法]以香港牡蛎为试验材料,利用 RACE-PCR 技术克隆获得了香港牡蛎钙调蛋白(CaM)基因 cDNA 序列,并进行生物信息学分析和 qRT-PCR 试验。[结果]香港牡蛎 CaM 基因的 cDNA 序列全长为 770 bp, 开放阅读框为 450 bp, 5' 端非编码区 54 bp, 3' 非编码区 266 bp, 共编码 149 个氨基酸; 预测 CaM 蛋白分子量为 16.82 kD, 理论等电点为 4.14, 亲水性(GRAVY)总平均值为 -0.656, 不稳定指数为 31.08, 属于稳定性亲水蛋白。氨基酸序列同源性和基因系统进化树结果显示, 香港牡蛎与长牡蛎的 CaM 相似性最高, 亲缘关系最近, 其系统进化分析与传统的形态学分类相吻合。实时荧光定量 PCR 结果显示, CaM 基因在香港牡蛎的各个组织中均有表达, 其中在鳃中的表达量最高($P < 0.05$), 外套膜次之, 鳃是参与牡蛎钙代谢中钙吸收的关键器官, 外套膜是分泌有机质的关键器官。[结论]推测该基因在香港牡蛎壳形成过程中调节钙的摄取、运输和分泌方面发挥重要作用。

关键词 香港牡蛎; 钙调蛋白; 基因克隆; 组织表达分析

中图分类号 S917.4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)24-0075-07

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.24.019



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Molecular Cloning and Expression Analysis of Calmodulin Gene in *Crassostrea hongkongensis*

LI Su-ping, YU Da-hui, LI Ying-qing et al (Guangxi Key Laboratory of Beibu Gulf Marine Biodiversity Conservation, College of Oceanography, Beibu Gulf University, Qinzhou, Guangxi 535011)

Abstract [Objective] To investigate the role and molecular mechanism of CaM in calcium metabolism of *Crassostrea hongkongensis* shells. [Method] The cDNA sequence of calmodulin (CaM) gene of *Crassostrea hongkongensis* was cloned by RACE-PCR and analyzed by bioinformatics and qRT-PCR. [Result] The results showed that the full length of CaM gene was 770 bp, open reading frame was 450 bp, 5' end non-coding region was 54 bp, 3' non-coding region was 266 bp, encoding 149 amino acids. The predicted molecular weight of CaM protein was 16.82 kD, and the theoretical isoelectric point was 4.14. The mean value of total rating of hydrophilicity (GRAVY) was -0.656, and the instability index was 31.08, which was a stable hydrophilic protein. The homology analysis of amino acid sequences and phylogenetic tree results showed that the CaM similarity between *Crassostrea hongkongensis* and *Crassostrea gigas* was the highest, and the phylogenetic analysis was consistent with the traditional morphological classification. Real-time quantitative PCR results showed that CaM gene was expressed in all tissues of *Crassostrea hongkongensis*, with the highest expression level in gills ($P < 0.05$), followed by the mantle. Gills were the key organs involved in calcium absorption during calcium metabolism of the Oyster, and the mantle was the key organ secreting organic matter. [Conclusion] It is speculated that this gene plays an important role in regulating calcium uptake, transport and secretion during oyster shell formation in *Crassostrea hongkongensis*.

Key words *Crassostrea hongkongensis*; Calmodulin; Gene cloning; Tissue expression

双壳类动物的贝壳都是钙代谢产物, 含有 90% 以上的 CaCO_3 晶体和百分之几的生物大分子基质^[1]。近 10 年, 人们为阐明壳的形成机制作出了许多努力, 已从双壳贝类中鉴定出 10 余种基质蛋白^[2-5]。然而, 以往对贝壳形成的分子机制研究集中于基质蛋白的纯化和表征上, 而忽略了贝类钙代谢的机制。钙离子不仅是参与双壳类动物许多生理过程的调节剂, 而且是参与壳结构形成的主要阳离子, 在贝壳的形成过程中, 需要大量的钙离子不断沉积在基质蛋白形成的骨架上^[6]。Ca²⁺ 摄取、积累、转运、掺入的机制以及这些过程中涉及的特定调节剂仍然是一个有吸引力的领域, 有待进一步研究。

钙调蛋白(Calmodulin, CaM)是一种主要的细胞内钙受体, 存在于许多不同的细胞类型中, 是动物中最保守的蛋白质之一。CaM 以钙离子(Ca²⁺)依赖性方式结合并调节蛋白

质丝氨酸/苏氨酸激酶。它参与一系列细胞过程, 包括分泌、细胞分裂和分化、DNA 复制和修复、肌肉收缩和糖原代谢、渗透细胞体积调节和细胞内通讯^[7]。在高等脊椎动物中, CaM 由多种基因编码, 如人和小鼠的 CaM I、II 和 III, 鸡的 CaM I 和 II^[8-9]。在双壳类生物中, 钙调蛋白可以调节 Ca²⁺-ATPase 膜系统来捕获环境中的 Ca²⁺, 细胞外 CaM 或 CaM 样蛋白(CaMLP)和 CaM 或 CaMLP 结合蛋白被认为在生物矿化中起重要作用^[10-11]。CaM 基因在外套膜裙带及外套膜表皮上高表达, 外套膜主要参与贝壳形成过程中 Ca²⁺ 的分泌, 因此, 双壳类动物体内的 CaM 不仅是参与许多生理过程的调控, 而且是贝壳结构形成的主要调控因素^[12]。

香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)分布于我国南部沿海, 是两广地区最常见、最主要的牡蛎养殖种类之一, 具有较高的营养价值和经济价值^[13-15]。但香港牡蛎生长速度缓慢, 养殖周期长, 沿海地区台风频繁, 牡蛎养殖深受其害, 常常造成巨大经济损失, 故在香港牡蛎的养殖产业中, 一直存在着提高生长速度、缩短养殖周期的强烈需求^[16]。香港牡蛎的生长与贝壳形成密切相关, 为提高香港牡蛎生长速度、缩短养殖周期, 加快贝壳的形成, 探究贝壳形成的分子矿化机制是重中之重^[17-19]。目前, CaM 作为生物体内重要的调控蛋

基金项目 广西重点研发计划项目(2018AB52002); 广西研究生教育创新计划项目(YCSW2021353, YCSW2020245); 国家重点研发计划项目(2018YFD0901406); 国家自然科学基金面上项目(31873042)。

作者简介 李素萍(1997—), 女, 河南周口人, 硕士研究生, 研究方向: 水产养殖。*通信作者, 高级工程师, 博士, 从事水产养殖与遗传育种研究。

收稿日期 2022-01-19; **修回日期** 2022-04-15

白,是贝壳形成的主要调控因素,因此以香港牡蛎为研究对象,对香港牡蛎贝壳形成的分子矿化机制进行研究。

笔者采用 RACE 技术克隆了香港牡蛎 *CaM* 基因 cDNA 全长序列,并分析其核酸和氨基酸序列,预测 *CaM* 二级结构和三级结构,并采用实时荧光定量 PCR 技术检测香港牡蛎 *CaM* 基因在不同组织中的表达情况,对香港牡蛎 *CaM* 基因的功能进行深入研究,旨在为研究香港牡蛎贝壳形成机制及 *CaM* 基因蛋白功能研究提供分子理论基础,为生产实践提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料 香港牡蛎采集于广西钦州市东风市场,取其新鲜的外套膜、鳃、闭壳肌、性腺、心脏、血淋巴、触唇和消化腺 8 个组织立即放入液氮速冻,置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 的合成 取香港牡蛎的闭壳肌、外套膜、鳃、血液、性腺、心脏、触唇和消化腺 8 个组织用研磨仪研磨,参照 TransZol Up Plus RNA Kit 试剂盒(全式金)提取总 RNA,使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 的完整性并用 Little Lunatic (USA) 测定其浓度,用 TransScript II One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 反转录试剂盒(全式金)合成模板 cDNA,置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 RACE 获得香港牡蛎 *CaM* 基因 cDNA 全长 根据 GenBank 中已知的太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) *CaM* 基因 cDNA 全长序列,设计特异性引物 *CaM*-F 和 *CaM*-R,扩增出目的片段,反应程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,运行 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。PCR 产物用 DNA 胶回收试剂盒 (TIANGEN) 纯化,参照 pEASY[®]-T1 Cloning Kit (全式金)说明书进行连接转化,阳性克隆送生工生物工程(上海)有限公司测序,测序结果与长牡蛎 *CaM* 基因 cDNA 序列比对,相似性极高。

根据测序出的目的片段设计 5'RACE 和 3'RACE 扩增的基因特异性引物,参照 5'RACE 试剂盒(北京百奥博莱科技)说明进行上游未知片段扩增,利用引物 5'RACE-A 将模板 RNA 进行逆转录成 cDNA,模板 cDNA 经加帽反应使用引物 5'RACE-B 进行第 1 轮反应,反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 2 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 4 min,进行 1 个循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min,进行 29 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终延伸 15 min。以稀释 20 倍的第 1 轮 PCR 产物为模板,用引物 5'RACE-C 进行第 2 轮反应,反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s; $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min,进行 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终延伸 15 min。

参照 3'RACE 试剂盒(北京百奥博莱科技)说明进行下游未知片段扩增,使用引物 3'RACE-A 进行第 1 轮反应,反应条件为: $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 min,1 个循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min,30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min。以稀释 20 倍的第 1 轮 PCR 产物为模板,引物 3'RACE-B 进行第 2 轮反应,反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s; $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min,30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终延伸 15 min。将 2 轮反应之后的 5'RACE 和 3'RACE PCR 产物分别进行胶回收后进

行连接转化,阳性克隆送生工生物工程(上海)有限公司测序。引物序列见表 1。

表 1 试验所用引物序列

Table 1 Sequences of primers in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Purpose
CaM-F	GACAGAATCTACAGAGGCAGAG	目的片段克隆
CaM-R	GGTGAAACAATCCCATTACTTAC	
5'RACE-A	CCCGAAGTTCCTCTTCTGA	5'RACE
5'RACE-B	TAGCCATCATCGTGAGGAAT	
5'RACE-C	CCATCAGCATCAACTTCGTT	
3'RACE-A	GACGGAAACGGTTTCATCA	3'RACE
3'RACE-B	TTTAGACGGTGATGGACAA	
qRTCaM-F	AAGCTTTCCTGTGTTTCGAT	荧光定量
qRTCaM-R	TGACTGTCCATCACCGTCT	
GAPDH F	GGATTGGCGTGGTGGTAGAG	荧光定量(内参基因)
GAPDH R	GTATGATGCCCTTTGTTGAGTC	

注: F 代表正向引物, R 代表反向引物

Note: F represents forward primer; R represents reverse primer

1.4 生物信息学分析 利用 NCBI 数据库中的 Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 和 ChromasPro.2.1.3 等软件对测序结果进行验证分析并拼接出全长 cDNA 序列。使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测该蛋白的基本理化性质; 使用 Soft Berry-PSite (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) 预测蛋白功能位点; 使用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 预测信号肽序列; 使用 TMpred (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMPred>) 预测跨膜结构域; 使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测该蛋白质结构域; 使用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_sopma.html) 和 SWISS-MODEL (<https://swiss-model.expasy.org/interactive>) 分别预测该蛋白质的二级和三级结构; 使用 PSORTII Prediction 软件 (<https://psort.hgc.jp/form2.html>) 进行亚细胞定位分析; 使用 Clustalx1.81 软件进行多重序列比对; 使用 MEGA 7.0 软件的邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育进化树, 进化距离的计算采用 Kimura 双参数模式。

1.5 荧光定量 PCR 分析 以香港牡蛎 8 个组织的 cDNA 为模板, 根据全长序列设计定量引物 qRTCaM-F 和 qRTCaM-R, 以 GAPDH 为内参基因, 每个样品进行 3 次重复。参照 TransStart[®] Tip Green qPCR SuperMix 荧光定量试剂盒(全式金)进行 qRT-PCR, 反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 进行 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s。数据由 Roche LightCycler 96 软件生成并记录, 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算组织表达水平, 采用 SPSS 22 软件进行单因素方差分析法 (one-way ANOVA), Tukey 检验, $P < 0.05$ 表示显著性差异。

2 结果与分析

2.1 香港牡蛎 *CaM* 基因 cDNA 全长序列 以香港牡蛎的 cDNA 为模板, 使用 RACE 试剂盒获得香港牡蛎钙调蛋白 *ChCaM* 基因序列全长 cDNA (Gen Bank 登录号为: MZ192519), 其全长为 770 bp, 开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 为 450 bp, 5'非编码区 (5'-UTR) 54 bp 及 3'非编

码区(3'-UTR)266 bp,香港牡蛎 *CaM* 基因编码 149 个氨基酸。通过 SMART 在线分析软件预测香港牡蛎 *CaM* 含有 4 个 EF-hand 结构域,分别位于 12~40、48~76、85~113、121~149 位氨基酸(图 1)。针对香港牡蛎 *CaM* 蛋白质进行理化性质分析,发现氨基酸理论分子量为 16.82 kD,带正电荷的氨基酸残基(Arg+Lys)有 15 个,带负电荷的氨基酸残基(Asp+Glu)有 38 个,理论等电点为 4.14。该蛋白脂溶指数(Aliphatic index)为 64.83,亲水性(GRAVY)总平均值为 -0.656,半衰期约为 30 h,不稳定指数为 31.08,因此该蛋白是

一类稳定的亲水性蛋白质。Soft Berry-Psite 预测该蛋白功能位点,发现香港牡蛎 *CaM* 具有 2 个 N-肉豆蔻酰化位点,7 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点,2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点和 1 个 N-糖基化位点(图 2)。使用 SignalP 4.1 Server 程序未能预测到信号肽信号;使用 TMpred 软件未发现跨膜结构,不属于跨膜蛋白;利用 PSORTIII Prediction 软件对香港牡蛎 *CaM* 蛋白进行亚细胞定位分析发现该蛋白在细胞质中分布最多,占 52.2%,在分泌系统小泡中分布最少,为 4.3%,细胞核和线粒体中分别为 30.4%和 13.0%。

1	TGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTGTTCCTCCCTTTCGACTACCATGGCCGATCAACTCACAGAAGAACAATGCTGAA	90
1		M A D Q L T E E Q I A E
91	TTCAAAGAGGCGTTTTCAGCCTTTTGTGACAAGGATGGAGATGGAACCATCACAAACAAAGAACTGGGTACAGTGATGAGGTCTCTAGGACAG	180
13	F K E A F S L F D K D G D G T I T T K E L G T V M R S L G Q	42
181	AATCCTACAGAGGCAGAACTTCAAGACATGATTAACGAAGTTGATGCTGATGGAATGGAACCATCGATTTCCAGAATTCCTCACGATG	270
43	N P T E A E L Q D M I N E V D A D G N G T I D F P E F L T M	72
271	ATGGCTAAGAAAATGAAGGATTCGATTGAGAAGGAAGCTTCGGGAAGCTTCCGTGTGTTTCGATAAAGACGGAAACGGTTTCATCAGC	360
73	M A K K M K D S D S E E E L R E A F R V F D K D G N G F I S	102
361	GCCGCTGAATTACGTCACGTGATGACAAATTTAGGAGAAAACTCACTGATGAGGAGGTGATGAAATGATCAGAGAGGCTGATTTAGAC	450
103	A A E L R H V M T N L G E K L T D E E V D E M I R E A D L D	132
451	GGTGATGGACAAGTCAACTACGAAGAATTTGTTGCAATGATGACCAGTAAGTAAATGGGATTGTTTCACCTAACAGAGCAGTACATCGA	540
133	G D G Q V N Y E E F V R M M T S K *	149
541	CTTCCACTCAAGGCCAGATCTTTTACATCAGTGTCTGAAAGTGAATCAAACACAGAAATGAGATCGTTTTATACTTTGTATATCTAGT	630
631	GAGACATTATACATACTTTTTTGAACATTGAATATTAATGATCTGACACATACATATTTTTATATGAACATTTTATTATTATGTTGA	720
721	ATAAACCTGTTGGAAAATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	770

注:方框表示起始密码子和终止密码子,绿色阴影部分为钙调蛋白结构域,黄色阴影部分为 AATAAA 加尾信号

Note: The boxes represent the start and stop codons, the green area represents the calmodulin domain, and the yellow area represents the AATAAA tail addition signal

图 1 香港牡蛎 *CaM* 基因的核酸序列和氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequence from *ChCaM* gene

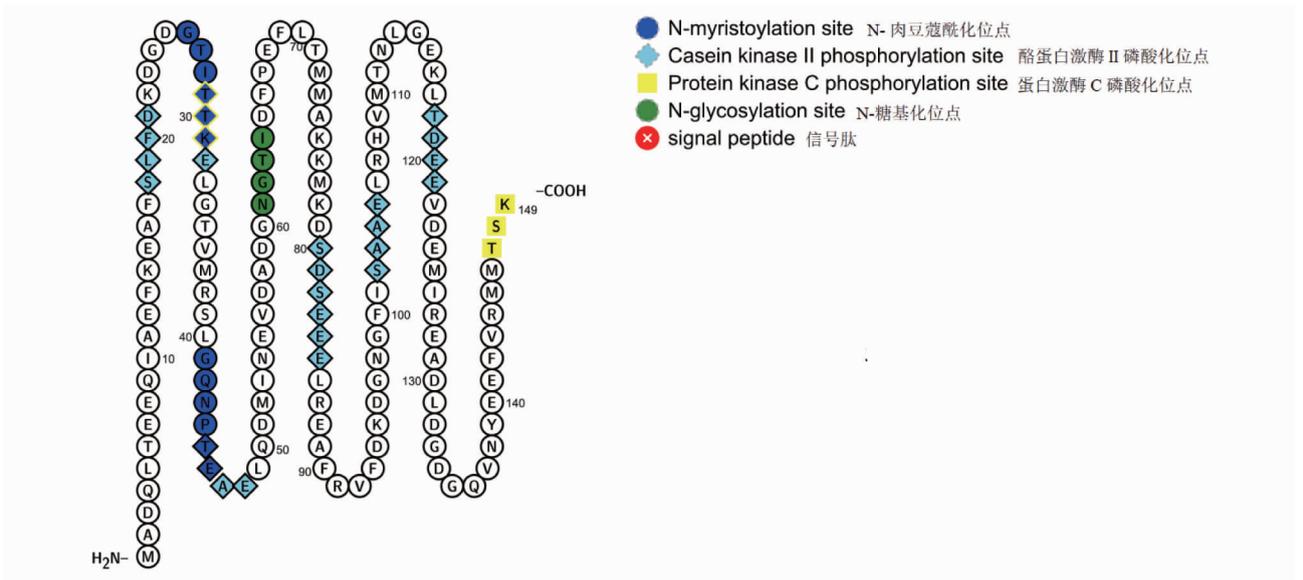
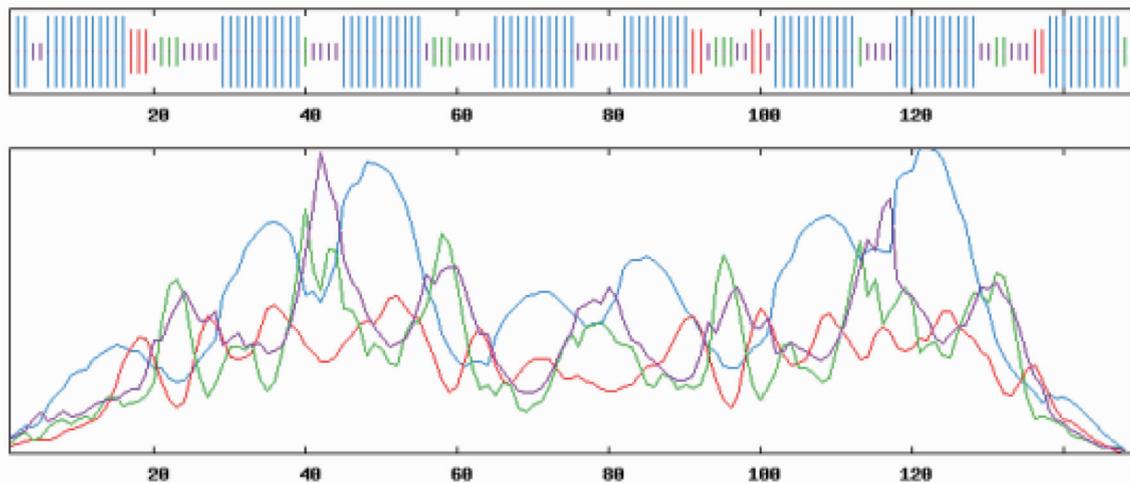


图 2 香港牡蛎 *CaM* 的功能位点预测

Fig.2 Prediction of functional site of *ChCaM*

2.2 香港牡蛎 CaM 结构预测 使用 SOPMA 工具对香港牡蛎 CaM 蛋白的二级结构进行预测,结果显示,CaM 预测蛋白包含 59.73% α 螺旋(alpha helix)、6.04% 延伸链(extended strand)、9.40% β 转角(beta turn)和 24.83% 不规则卷曲(ran-

dom coil)(图 3)。通过 SWISS-MODEL 对香港牡蛎和人的 CaM 基因编码的蛋白进行三级结构模拟,模拟发现二者蛋白三级结构相似性极高(图 4)。

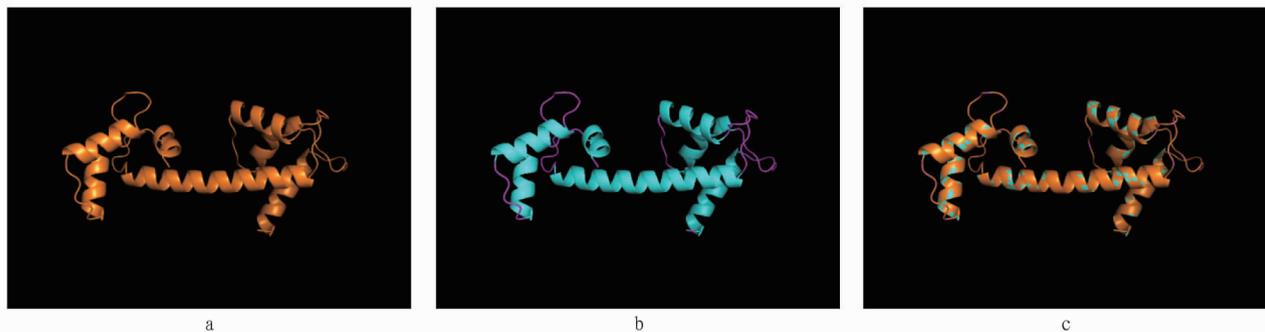


注:蓝色. α 螺旋;红色.延伸链;绿色. β 转角;粉红.不规则卷曲

Note: Blue. Alpha helix; Red. Extended strand; Green. Beta turn; Pink. Random coil

图 3 香港牡蛎 CaM 蛋白质二级结构预测

Fig.3 Predicted two-dimensional structure of ChCaM



注:a.香港牡蛎;b.人;c.叠加

Note:a.*Crassostrea hongkongensis*;b.*Homo sapiens*;c.Overlay

图 4 CaM 蛋白质三级结构预测

Fig.4 Predicted three-dimensional structure of CaM

2.3 香港牡蛎 CaM 氨基酸序列同源性 从 NCBI 下载 11 个其他物种 CaM 氨基酸序列(表 2),经 DNASTAR 软件对香港牡蛎与其他物种的 CaM 进行氨基酸序列同源性分析(图 5),结果发现香港牡蛎和长牡蛎的 CaM 同源性最高,相似度高达 100%,美洲牡蛎次之,达到 98.7%,其他物种的相似度为 93%~97%。运用 DNAMAN 软件将香港牡蛎 CaM 的氨基酸序列与其他已公布的 8 种生物进行多重序列比对分析(图 6),结果显示,香港牡蛎 CaM 氨基酸序列与长牡蛎和美洲牡蛎有较高的相似性,而与鱼类、甲壳类和哺乳动物序列相似性相对较低;CaM 氨基酸排序呈现很高的相似性和高度保守性。结果表明,CaM 的氨基酸序列具有典型的钙调蛋白特征(EF-hand 结构域),发现以上 9 个物种均有 4 个 EF-hand 结构域(I、II、III 和 IV),且它们表现出彼此的序列同源性。每个结构域由 12 个氨基酸残基组成,其中 6 个作为金属-蛋白

质复合物中 Ca^{2+} 的配体[如天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)]。*CaM* 基因所编码的氨基酸序列高度保守,尤其表现在 EF-hand 结构域 Ca^{2+} 结合位点上,暗示 *CaM* 基因在机体中有极其重要的功能和作用。

2.4 *ChCaM* 基因系统进化树 为比较不同物种 *CaM* 基因序列的亲缘关系,从 NCBI 数据库中查找其他物种 *CaM* 基因 cDNA 序列,用 MEGA 7.0 软件构建 *ChCaM* 与其他物种的系统进化树(图 7),结果显示,香港牡蛎 *CaM* 与长牡蛎的遗传距离最近,并与美洲牡蛎、虾夷扇贝和池蝶蚌等双壳类动物聚为一大支,具有较高的同源性,而与文昌鱼和虹鳟等鱼类、人和小鼠等哺乳动物以及中华绒螯蟹和克氏原螯虾等甲壳类动物分支较长,距离较远,同源性较低。

2.5 香港牡蛎 *CaM* 基因的组织特性表达 使用 SPSS 22.0 软件进行单因素分析,通过实时定量 PCR 的方法检测香港

牡蛎 CaM mRNA 在各个组织中的表达量,结果表明, *CaM* 基因在香港牡蛎各个组织中均有表达,其中鳃组织的表达量最高,其次为外套膜、消化腺、触唇、血淋巴、性腺、闭壳肌,在心脏的表达量最低(图 8)。

		Percent Identity 同源百分比													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Divergence 差异百分比	1	100.0	98.7	96.6	96.6	95.3	94.6	93.3	95.3	96.6	96.0	97.3	<i>C.hongkongensis</i> 香港牡蛎		
	2	0.0	100.0	98.7	96.6	96.6	95.3	94.6	93.3	95.3	96.6	96.0	97.3	<i>C.gigas</i> 长牡蛎	
	3	1.4	1.4	100.0	95.3	95.3	94.0	93.3	91.9	94.0	95.3	94.6	96.0	<i>C.virginica</i> 美洲牡蛎	
	4	3.4	3.4	4.9	100.0	99.3	98.0	97.3	96.0	98.0	100.0	99.3	99.3	<i>M.yessoensis</i> 虾夷扇贝	
	5	3.4	3.4	4.9	0.7	100.0	98.0	97.3	96.6	98.0	99.3	98.7	99.3	<i>S.schlegelii</i> 池螺蚌	
	6	4.9	4.9	6.3	2.0	2.0	100.0	99.3	94.6	100.0	98.0	97.3	98.0	<i>H.sapiens</i> 人	
	7	5.6	5.6	7.0	2.7	2.7	0.7	100.0	94.0	99.3	97.3	96.6	97.3	<i>M.musculus</i> 小鼠	
	8	7.0	7.0	8.5	4.1	3.4	5.6	6.3	100.0	94.6	96.0	96.6	96.0	<i>B.floridae</i> 文昌鱼	
	9	4.9	4.9	6.3	2.0	2.0	0.0	0.7	5.6	100.0	98.0	97.3	98.0	<i>O.mykiss</i> 虹鳟	
	10	3.4	3.4	4.9	0.0	0.7	2.0	2.7	4.1	2.0	100.0	99.3	99.3	<i>E.sinensis</i> 中华绒螯蟹	
	11	4.1	4.1	5.6	0.7	1.4	2.7	3.4	3.4	2.7	0.7	100.0	98.7	100.0	<i>P.vannamei</i> 凡纳滨对虾
	12	2.7	2.7	4.1	0.7	0.7	2.0	2.7	4.1	2.0	0.7	1.4	100.0	100.0	<i>P.clarkii</i> 克氏原螯虾

图 5 香港牡蛎 CaM 氨基酸与其他 11 个物种的同源百分比

Fig.5 Percent identity of CaM amino acids of *Crassostrea hongkongensis* and other 11 species

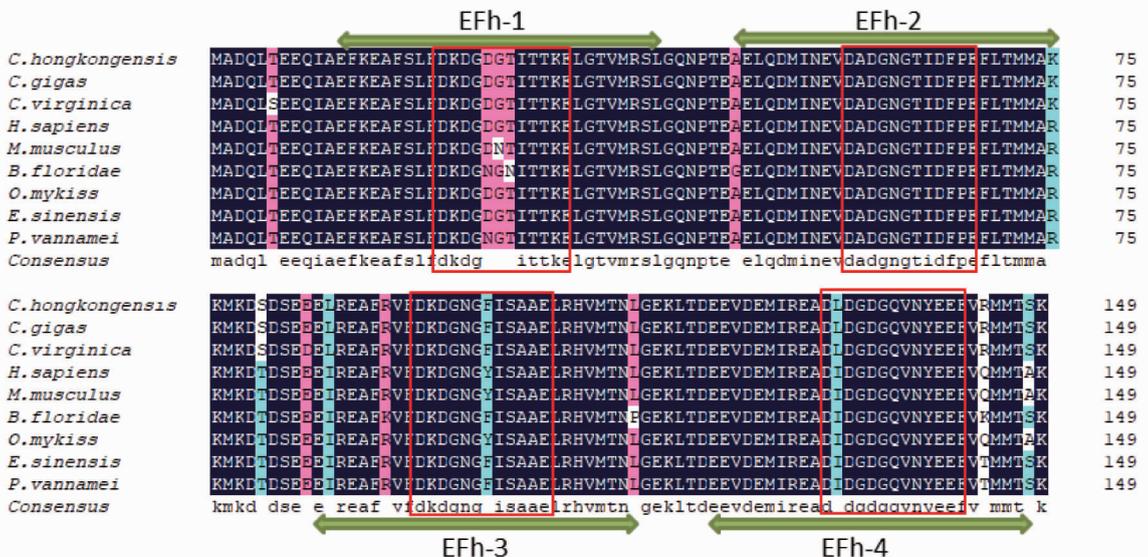
表 2 同源百分比与序列比对所用物种

Table 2 Species used in alignment and percent identity

物种名称 Species name	氨基酸序列名称 Amino acid name	登录号 Accession number
长牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	calmodulin	XP_011436588.1
美洲牡蛎 <i>Crassostrea virginica</i>	calmodulin-like	XP_022331543.1
虾夷扇贝 <i>Mizuhopecten yessoensis</i>	calmodulin	XP_021349564.1
池螺蚌 <i>Sinohyriopsis schlegelii</i>	calmodulin	ACI22622.1
人 <i>Homo sapiens</i>	calmodulin	AAA35635.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	calmodulin	AAA66182.1
文昌鱼 <i>Branchiostoma floridae</i>	calmodulin 2	CAB40132.2
中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	calmodulin	AIE56158.1
凡纳滨对虾 <i>Penaeus vannamei</i>	calmodulin A	AEK21539.1
克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>	calmodulin	ACI15835.1

3 讨论

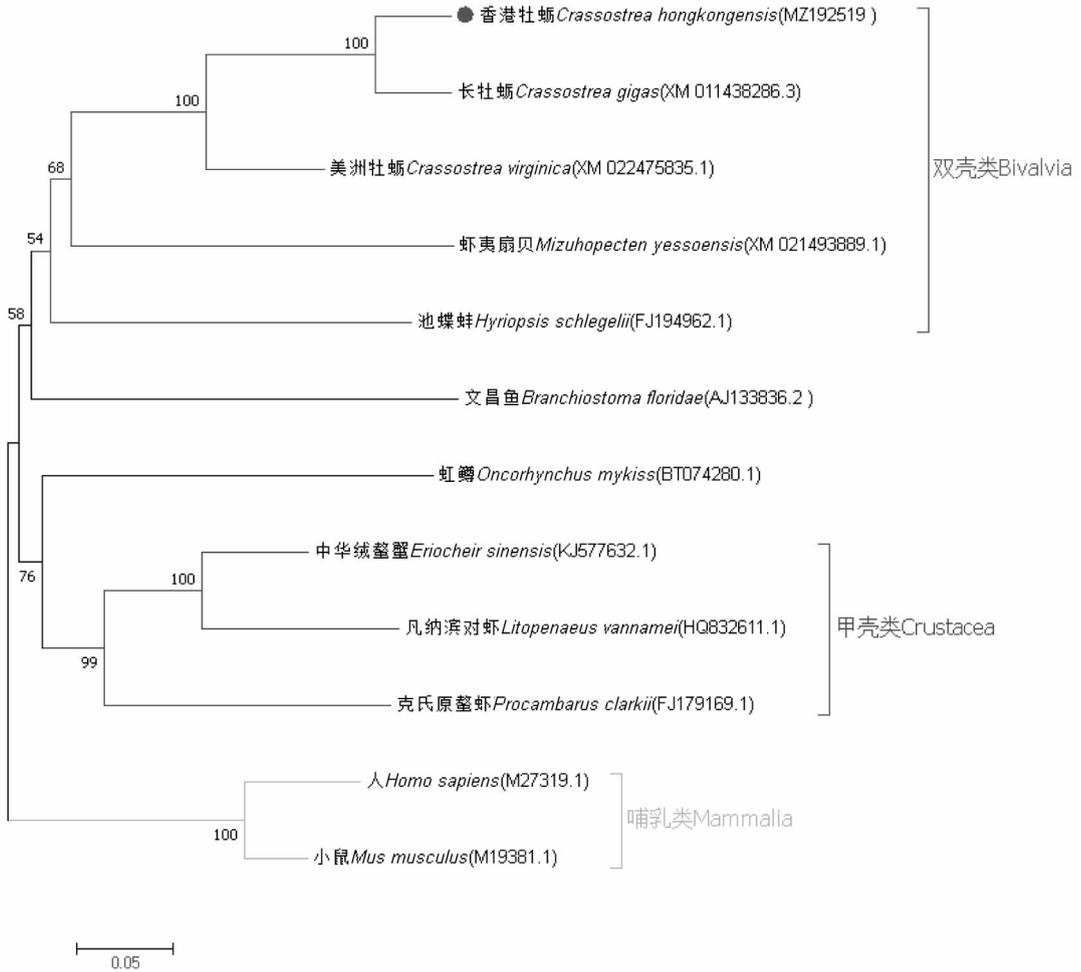
3.1 香港牡蛎 CaM 基因 cDNA 序列特征和系统进化 钙调蛋白是贝类中重要的调控蛋白,是钙离子结合蛋白家族成员,能够结合微量钙离子,对真核细胞内的酶起到激活作用,调节细胞的生命活动,进而调控 Ca²⁺ 的吸收、转运和分泌^[20-21]。该研究利用 RACE 技术克隆获得香港牡蛎 CaM 基因的 cDNA 序列,全长为 770 bp,编码 149 个氨基酸。生物信息学分析香港牡蛎 CaM 蛋白具有 4 个典型的 EF-hand 结构域,能够与钙离子结合,属于典型的钙离子结合蛋白家族成员,这与已有研究报道的合浦珠母贝体内的钙调蛋白的结构域相似^[10]。钙调蛋白是一种由 148 个氨基酸残基组成的蛋白质,可形成 2 个球状区域,由 1 个灵活的中心连接器连接^[22]。



注:颜色表示氨基酸序列相似度(黑色.100%;粉色.70%;绿色.≥50% 及<70%;白色.<50%),上方绿色箭头表示 4 个 EF-hand 结构域,红色方框为 EF-hand 钙结合域

Note:The color indicates the similarity of amino acid sequence(black.100%;Pink.70%;Green.≥50% and <70%;White.<50%).Green arrow indicates 4 EF-hand domains above,the red box is EF-hand calcium-binding domain

图 6 香港牡蛎 CaM 氨基酸序列与其他物种 CaM 的序列比对
Fig.6 Alignment CaM amino acid of *Crassostrea hongkongensis* and other species

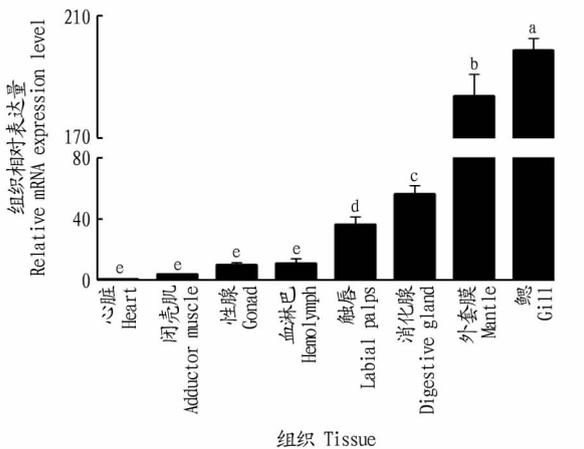


注:括号中为 GenBank 登录号

Note: The GenBank entry number is given in parentheses

图7 *CaM* 核酸序列构建的系统进化树

Fig.7 Phylogenetic tree of *CaM* from various species



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different lowercase letters indicate significantly different ($P < 0.05$)

图8 *CaM* 基因在香港牡蛎不同组织的表达情况

Fig.8 Expression pattern of *CaM* gene in different tissues of *Crassostrea hongkongensis*

每个区域结合 EF-hand 基序中的 2 个钙离子,这是钙结合蛋

白中普遍存在的一个基序,因此钙调蛋白可以结合 4 个钙离子,与哺乳动物人和软体动物香港牡蛎的三级结构预测结果一致。钙结合位点为 12 个氨基酸,包含许多负电荷或极性氨基酸残基,如天冬氨酸、谷氨酸和天冬酰胺,这些氨基酸的侧链与 Ca^{2+} 形成离子键。*CaM* 含有丰富氧原子侧链的氨基酸残基,即使在 Ca^{2+} 浓度很低的环境中也能吸引钙离子促进 Ca^{2+} 与氨基酸结合。氨基酸的功能位点预测发现,其 4 个 EF-hand 结构域上有 1 个 N-糖基化位点,2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点,3 个酪氨酸激酶磷酸化位点等,表明其在细胞与细胞间结合和信号传导过程中起着重要作用。

钙调蛋白是一种必需的蛋白质,也是一种稳定的蛋白质,任何一种钙调蛋白编码基因的突变或者钙调蛋白结合位点的损伤通常都是致命的^[7]。来自不同脊椎动物物种的 *CaM* 基因编码具有相同氨基酸序列的相同 *CaM* 分子,表明其在脊椎动物进化过程中高度保守^[23]。此外,2 个不同的无脊椎动物海葵 (*Metridium senile*) 和池蝶蚌 (*Hyriopsis schlegelii*) 也编码相同的 *CaM* 蛋白,表明 *CaM* 蛋白在无脊椎动物进化过程中也高度保守^[23-24]。通过多序列比对,发现香港牡蛎 *CaM* 基因与长牡蛎 *CaM* 基因的同源性最高,核酸序列同源

性为 97.11%,氨基酸序列同源性高达 100%,说明 CaM 蛋白在双壳类动物进化过程中高度保守,进一步反映了这种蛋白质在细胞正常功能中的重要性。比较香港牡蛎 *CaM* 基因核酸序列 EF-hand 结构域之间的同源性,发现 EFh1 和 EFh3 与 EFh2 和 EFh4 核酸序列具有高度同源性,均为 57.5%,表明参与钙离子结合的部分分子比其他部位更保守^[10]。构建系统发育树发现,香港牡蛎 *CaM* 基因和长牡蛎 *CaM* 基因位于同一分支,说明香港牡蛎和长牡蛎的亲缘关系较近,与其他物种的亲缘关系较远,这与他们的生物学分类相符。由此推测,CaM 保守结构域在进化过程中具有较高的保守性,并且不同物种有不同的差异性。

3.2 香港牡蛎 *CaM* 基因的组织表达分析 贝壳形成是一个复杂、精密调控的生物矿化过程,自然条件下构成贝壳的碳酸钙晶体并不是在单一组织作用下形成的,而是多个组织共同作用的结果^[25-26]。荧光定量检测发现,*CaM* 基因在香港牡蛎鳃组织中表达量最高,是心脏组织表达量的(198.57±4.00)倍,与合浦珠母贝和池蝶蚌 *CaM* 基因组织表达趋势相同^[24]。在双壳类动物中,鳃是从水中吸收钙的主要器官,在膜 Ca²⁺-ATP 酶系统中发挥调节作用^[27-28]。香港牡蛎 *CaM* 在鳃组织中高表达,说明 CaM 在香港牡蛎鳃吸收和积累钙的过程中具有重要的调控作用。在软体动物中,外套膜与贝壳直接接触的区域能够分泌角质层和钙化层^[29],是壳的形成过程中的关键调控因子。笔者发现 *CaM* 基因在香港牡蛎外套膜组织中表达量是心脏组织的表达量的(183.64±7.18)倍,这与其他动物的报道相似。这暗示了香港牡蛎 *CaM* 基因通过鳃和外套膜组织共同参与调控 Ca²⁺ 的吸收、转运和分泌等钙代谢途径。由此推测香港牡蛎贝壳的形成是由鳃从外界环境中吸收 Ca²⁺ 并转运到外套膜中,并通过钙泵将离子从外套膜运输到外套腔分泌中形成贝壳。因此,在贝类贝壳形成的生物矿化过程中,钙调蛋白被认为有极其重要的作用。

4 结论

本研究克隆了香港牡蛎 *CaM* 基因 cDNA 序列,全长为 770 bp,编码 149 个氨基酸,具有 4 个 EF-hand 结构域。通过多序列比对及构建系统发育树发现,香港牡蛎 *CaM* 基因与长牡蛎 *CaM* 基因的同源性最高(97.11%),并且位于同一分支。荧光定量检测发现,*CaM* 基因在香港牡蛎各组织中都有表达,其中鳃组织的表达量最高,其次为外套膜、消化腺、触唇、血淋巴、性腺、闭壳肌,心脏的表达量最低。该研究结果将有望为香港牡蛎贝壳形成的生物矿化机制及 *CaM* 基因功能研究提供基础资料。

参考文献

[1] ARNON A, COOK B, MONTELL C, et al. Calmodulin regulation of calcium stores in phototransduction of *Drosophila* [J]. *Science*, 1997, 275 (5303): 1119-1121.

[2] ZHANG Y, XIE L P, MENG Q X, et al. A novel matrix protein participating in the nacre framework formation of pearl oyster, *Pinctada fucata* [J]. *Comparative biochemistry and physiology part B: Biochemistry and molecular biology*, 2003, 135 (3): 565-573.

[3] MARIN F, LUQUET G. Molluscan biomineralization: The proteinaceous shell constituents of *Pinna nobilis* L. [J]. *Materials science & engineering C*, 2005, 25 (2): 105-111.

[4] TAKEUCHI T, ENDO K. Biphasic and dually coordinated expression of the genes encoding major shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. *Marine biotechnology*, 2006, 8 (1): 52-61.

[5] ZHANG C, ZHANG R Q. Matrix proteins in the outer shells of molluscs [J]. *Marine biotechnology*, 2006, 8 (6): 572-586.

[6] SIMKISS K, WILBUR K M. *Biomineralization: Cell biology and mineral deposition* [M]. San Diego, CA: Academic Press, 1989.

[7] FELICIANO D M, EDELMAN A M. Repression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV signaling accelerates retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma cells [J]. *Journal of biological chemistry*, 2009, 284 (39): 26466-26481.

[8] FISCHER R, KOLLER M, FLURA M, et al. Multiple divergent mRNAs code for a single human calmodulin [J]. *Journal of biological chemistry*, 1988, 263 (32): 17055-17062.

[9] NOJIMA H. Structural organization of multiple rat calmodulin genes [J]. *Journal of molecular biology*, 1989, 208 (2): 269-282.

[10] LI S, XIE L P, ZHANG C, et al. Cloning and expression of a pivotal calcium metabolism regulator: Calmodulin involved in shell formation from pearl oyster (*Pinctada fucata*) [J]. *Comparative biochemistry & physiology part B: Biochemistry & molecular biology*, 2004, 138 (3): 235-243.

[11] YAN Z G, FANG Z, MA Z J, et al. Biomineralization: Functions of calmodulin-like protein in the shell formation of pearl oyster [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2007, 1770 (9): 1338-1344.

[12] MOUNT A S, WHEELER A P, PARADKAR R P, et al. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster [J]. *Science*, 2004, 304 (5668): 297-300.

[13] REN J F, HOU Z H, WANG H Y, et al. Intraspecific variation in mitogenomes of five *Crassostrea* species provides insight into oyster diversification and speciation [J]. *Marine biotechnology*, 2016, 18 (2): 242-254.

[14] FAN C, KOENIGER P, WANG H, et al. Sclerochronology of Holocene oyster shells (*Crassostrea gigas*) from the West Coast of Bohai Sea, China [R]. 2009.

[15] PENG J X, LI Q Z, XU L, et al. Chromosome-level analysis of the *Crassostrea hongkongensis* genome reveals extensive duplication of immune-related genes in bivalves [J]. *Molecular ecology resources*, 2020, 20 (4): 980-994.

[16] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴 2016 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2016.

[17] HE X, LI C Y, QI H G, et al. A genome-wide association study to identify the genes associated with shell growth and shape-related traits in *Crassostrea gigas* [J]. *Aquaculture*, 2021, 543 (22): 1-9.

[18] LAM K, MORTON B. Mitochondrial DNA and morphological identification of a new species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) cultured for centuries in the Pearl River Delta, Hong Kong, China [J]. *Aquaculture*, 2003, 228 (1/2/3/4): 1-13.

[19] 范昌福, 王宏, 裴艳东, 等. 牡蛎壳体的同位素贝壳年轮研究 [J]. *地球科学进展*, 2010, 25 (2): 163-173.

[20] DELANEY K J, XU R Q, ZHANG J X, et al. Calmodulin interacts with and regulates the RNA-binding activity of an *Arabidopsis* polyadenylation factor subunit [J]. *Plant physiology*, 2006, 140 (4): 1507-1521.

[21] 任睿. 太平洋牡蛎群体遗传多样性的 SRAP 分析及巨蜆属牡蛎系统学初步研究 [D]. 广州: 中国科学院南海海洋研究所, 2008: 12-25.

[22] FINKLER A, ASHERY-PADAN R, FROMM H. CAMTAs: Calmodulin-binding transcription activators from plants to human [J]. *FEBS letters*, 2007, 581 (21): 3893-3898.

[23] YUASA H J, SUZUKI T, YAZAWA M. Structural organization of lower marine nonvertebrate calmodulin genes [J]. *Gene*, 2001, 279 (2): 205-212.

[24] ZENG L G, WANG J H, LI Y J, et al. Molecular characteristics and expression of calmodulin cDNA from the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis schlegelii* [J]. *Genetics & molecular research*, 2012, 11 (1): 42-52.

[25] 黄荣蓬. 珍珠贝壳蛋白组学及胁迫环境下的应激调控网络 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院 (海洋研究所), 2016: 28-40.

[26] 谢军. 间液蛋白在合浦珠母贝贝壳形成中的作用机制研究 [D]. 北京: 清华大学, 2016: 10-16.

[27] STOMMEL E W. Calcium activation of mussel gill abfrontal cilia [J]. *Journal of comparative physiology A*, 1984, 155 (4): 457-469.

[28] ROUSSEAU M, PLOUGUERNÉ E, WAN G, et al. Biomineralisation markers during a phase of active growth in *Pinctada margaritifera* [J]. *Comparative biochemistry and physiology part A: Molecular & integrative physiology*, 2003, 135 (2): 271-278.

[29] 张英霞, 邹爱敏, 满初日嘎, 等. 马氏珠母贝鳃组织抗菌活性的研究 [J]. *水产科学*, 2010, 29 (8): 465-468.