

文章编号: 1000-0615(2019)11-2336-11

DOI: 10.11964/jfc.20180911460

## 瘤背石磺钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶IV (CaMKIV) 基因的克隆及组织表达

梁 威, 杨铁柱, 沈和定\*, 许国绿, 顾冰宁, 薛宝宝

(上海海洋大学, 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 水产科学国家级实验教学示范中心,  
海洋动物系统分类与进化上海高校重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶IV (CaMKIV)是一种广泛存在于真核生物中的调控因子, 在生物体内具有多种生理功能。为了探究瘤背石磺中CaMKIV的作用和分子机制, 为进一步阐述CaMKIV的生理功能提供科学的理论依据。本实验以瘤背石磺神经节为实验材料, 利用RACE-PCR技术克隆得到CaMKIV基因的cDNA序列, 并进行生物信息学分析和qRT-PCR实验。结果显示, 瘤背石磺CaMKIV基因的cDNA全长1 603 bp, 开放阅读框为1 032 bp, 5'非编码区315 bp, 3'非编码区256 bp, 共编码343个氨基酸; 预测该基因编码的多肽链原子数量是5 490, 分子量约为3.87 ku, 理论等电点6.12, 分子式为 $C_{1741}H_{2768}N_{452}O_{514}S_{15}$ , N端信号肽由1~29个氨基酸组成。氨基酸序列比对及系统进化树结果显示, 瘤背石磺CaMKIV基因与加州海兔、光滑双脐螺CaMKIV基因的亲缘关系最为接近, 其系统进化分析与传统的形态学分类相吻合。荧光定量PCR结果显示, CaMKIV基因在各个组织均有表达, 其中在腹足的相对表达量最高, 其次是背部皮肤、口器, 而在神经节组织、蛋白腺、肠、肝胰腺等脏器组织的相对表达量较低, 初步推测, 该基因在瘤背石磺的神经调节中发挥重要作用, 或为生物机体感知外界环境变量因素的分子基础。本实验为今后进一步了解瘤背石磺神经结构生理功能的调节以及与CaMKIV基因功能研究奠定理论支撑, 也为探究海洋动物由海洋向陆地进化过程中对环境的适应机制提供参考。

**关键词:** 瘤背石磺; CaMKIV; 基因克隆; 实时荧光定量PCR; 组织表达分析

**中图分类号:** Q 785; S 968.31

**文献标志码:** A

石磺属(*Onchidium*)隶属软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、肺螺亚纲(Pulmonata)、柄眼目(Stylommatophora)<sup>[1]</sup>。我国沿海分布的石磺科种类主要有4种, 分别为平疣桑椹石磺(*Platevindex mortoni*)、里氏拟石磺(*Paraoncidium reevesii*)、瘤背石磺(*O. struma*)、紫色疣石磺(*Peronia verruculata*)。瘤背石磺又名海蛤、海癞蛤蟆、土鸡, 广泛分布于我国东部沿海地区, 是一种栖息于潮间带高潮区半咸水区域、江河口、红树林及芦苇中的滩涂肺螺亚纲贝类。野生瘤背石磺退潮时出来摄食, 涨潮前返回洞穴中规避海浪<sup>[2]</sup>。瘤背石磺体型一般呈椭圆形或圆

形, 体表有很多瘤状突起, 具黑色的背眼, 背部灰、褐、青兰等颜色可以帮助其很好地拟态伪装<sup>[3]</sup>。瘤背石磺在市场上深受人们的喜爱, 是一种具有重要营养价值和药用价值的两栖性贝类。之前对瘤背石磺的研究主要在与生长性状相关方面展开, 如温度<sup>[4]</sup>、盐度<sup>[5]</sup>对瘤背石磺生长的影响。近些年, 在瘤背石磺的遗传多样性<sup>[6]</sup>、线粒体基因组学<sup>[7]</sup>和蛋白质组学方面也有开展部分研究<sup>[8]</sup>, 但在功能基因学方面仅限于对皮肤、表皮、肌肉等相关基因的克隆<sup>[9-10]</sup>, 尚未涉及到与神经调节相关基因克隆的研究。

位于神经组织中的钙/钙调蛋白依赖性蛋白

收稿日期: 2018-09-25 修回日期: 2018-10-25

资助项目: 国家自然科学基金(41276157); 上海高校水产学一流学科建设项目

通信作者: 沈和定, E-mail: hdshen@shou.edu.cn

激酶(calcium/calmodulin dependent protein kinase, CaMKIV)参与神经突触的可塑性调节。酸化酶激酶通过磷纯化于1959年第一次得到<sup>[11]</sup>, 经过30多年的发展, 人们获得了数百种经纯化的蛋白激酶(PK)。蛋白激酶的主要功能是调节细胞之间的信息传递以及一些特定的生理功能<sup>[11]</sup>。CaMKIV是Ser/Thr激酶家族成员<sup>[12]</sup>, CaMKIV蛋白结构域由催化区、自抑制结构域、钙调蛋白结合域组成。CaMKIV基因所编码的蛋白主要参与细胞的信号传递, 包括细胞增殖<sup>[13]</sup>、分化和细胞凋亡等相关的钙信号级联<sup>[14]</sup>。Ca<sup>2+</sup>作为重要的第二信使, 钙调素(CaM)是Ca<sup>2+</sup>结合的主要受体, Ca<sup>2+</sup>和CaM结合后能形成多种复合物。发挥信号转导途径的基本流程: 钙离子的内流激活Ca<sup>2+</sup>-CaM结合体, 进而激活下游CaMKIV因子, CaMKIV通过磷酸化和去磷酸化作用后驱动环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)发生磷酸化作用<sup>[15-16]</sup>, 引起神经元发生生长时程增强效应(long-term potentiation, LTP), 而LTP被认为是学习、记忆的基础。

随着生命科学技术的快速发展, 科学界对CaMKIV蛋白的研究非常重视, 包括基因的克隆、蛋白的功能分析, 并进行了大量的与其相关的通路功能的研究。目前对CaMKIV基因的研究主要集中在脊椎动物中, 还未有对无脊椎动物中CaMKIV基因克隆与功能分析的报道。然而对CaMKIV基因的克隆和功能表达分析主要集中在人类(*Homo sapiens*)<sup>[17]</sup>、大鼠(*Rattus norvegicus*)<sup>[18]</sup>等。近些年来, 针对CaMKIV基因相应核酸的分子探针和蛋白质印迹法已经陆续被报道<sup>[19]</sup>, 从而为研究低等无脊椎动物提供了技术支撑。本研究是基于瘤背石磺神经组织转录组数据库, 筛选并克隆出CaMKIV基因的cDNA全长, 对其氨基酸序列进行了同源性分析和各组织的荧光定量PCR(qRT-PCR)分析。本实验结果为今后对该基因进行其他分子生物学实验提供数据支撑, 也为深入研究无脊椎动物从海洋向陆地进化过程中神经调节的变化与环境之间相互适应关系提供新视角。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用瘤背石磺为2018年5月采自江苏盐城, 采回的实验样品置于塑料培养箱进行暂

养, 暂养期间每天定时定点投喂玉米粉, 并及时清理粪便, 清除死亡个体, 添加适量的水, 室内温度保持在(26±0.5) °C。实验个体体质量约为(12.08±0.12) g, 体长(6.20±0.13) cm。

### 1.2 实验方法

**RNA的提取和cDNA克隆** 实验选取6个健康、活力良好且体质量和体长一致的瘤背石磺, 分别取神经节部位, 采用Trizol (TaKaRa, 大连)试剂提取RNA, RNA的提取按照试剂盒使用方法进行, 通过1.2%琼脂糖凝胶电泳检测5S rRNA、18S rRNA、28S rRNA条带完整性, 并用NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, 美国)检测RNA的浓度, 稀释后保持RNA浓度为500~1 000 ng/μL。以瘤背石磺神经组织中的RNA为模板, 用PrimerScript™ RT试剂盒(TaKaRa, 大连)反转录合成cDNA。

**CaMKIV基因克隆** 从本实验已测得的神经转录组数据库中筛选出一条与神经LTP信号传递相关的序列, 在NCBI数据库中进行BLAST比对, 结果显示, 该基因与其他物种的CaMKIV基因具有很高的同源性。利用Primer Premier 5.0软件<sup>[20]</sup>在ORF范围内设计引物CaMKIV-F1、CaMKIV-R1(表1)对目的基因片段进行PCR扩增。PCR反应体系: 20 μL: 2×Taq Master Mix 10 μL (Novo Protein, 上海), ddH<sub>2</sub>O 8 μL, CaMKIV-F1 0.6 μL, CaMKIV-R1 0.6 μL, cDNA 0.8 μL。PCR反应程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 61.1 °C 30 s, 72 °C 60 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 经割胶回收试剂盒(天根生化科技北京有限公司)回收目的条带, 并与pGEM-TEasy vector (Promega, 美国)进行连接转化, 经过LB平板蓝白斑筛选阳性克隆, 选取白斑菌落, 利用引物(表1)进行菌液PCR反应检测后, 将与目的片段大小一致的菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

根据测序获得的CaMKIV基因序列, 利用Primer premier 5.0设计3'和5'RACE特异性引物, 3'RACE引物设计按照3'Full RACE Core Set With PrimerScript™ RTase使用说明, 5'RACE引物设计按照SMARTER® RACE5'/3'Kit User Manual使用手册, 并在5'RACE特异性引物前添加15 bp的同源序列。3'RACE PCR反应程序: 反转录合成cDNA PCR反应条件: 42 °C 60 min, 72 °C

表1 实验所用的引物序列

Tab. 1 Sequences of primers used in this study

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	引物用途 usage
<i>CaMKIV-F</i>	TTCAGAGGAGCAAGCAGCC	片段验证引物
<i>CaMKIV-R</i>	ATTCCCGTCACCCACACAT	片段验证引物
<i>CaMKIV-5'RACE outer</i>	GATTACGCCAAGCTTTGCCGTCACCCACACCTGCGTCAAG	5'RACE特异性引物
<i>CaMKIV-5'RACE inner</i>	GATTACGCCAAGCTTAGCCTGGTGTCCGCATACTGTCGTC	5'RACE特异性引物
<i>CaMKIV-3'RACE outer</i>	TGGAGTGTGGAGTCATAGCA	3'RACE特异性引物
<i>CaMKIV-3'RACE inner</i>	TGCTAAGGATTTGGTGCAGAA	3'RACE特异性引物
<i>CaMKIV-RT-F</i>	GGGTGACGGGAATGGCCAACA	目的基因荧光定量引物
<i>CaMKIV-RT-R</i>	GTGGCTCCCGCAACTGCCAT	目的基因荧光定量引物
18S-RT-F	TGTCTCTGCGCTACCTGTT	内参基因荧光定量引物
18S-RT-R	ATTCCATGCGCAATTATTCA	内参基因荧光定量引物

15 min; outer PCR反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30个循环; 72 °C 10 min; inner PCR反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30个循环; 72 °C 10 min。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 选取预计目的条带经过割胶回收试剂盒(天根生化科技北京有限公司)回收目的条带, 并与pGEM-TEasy vector (Promega, 美国)进行连接转化, 连接反应体系: 2×Rapid Ligation Buffer 5 μL, pGEM-TEasy vector(50 ng)1 μL, PCR反应产物1 μL, T4 DNA Ligase 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 2 μL。经16 °C 孵育过夜后转化到感受态DH5α大肠杆菌细胞后涂布于含有氨苄的选择性培养基上, 37 °C培养16~24 h, 经过蓝白斑筛选后, 选取白斑菌落扩大培养, 进行菌液PCR反应检测, 挑取与目的片段一致的菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。5'RACE touchdown PCR程序: 94 °C 30 s, 72 °C 2 min, 5个循环; 94 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 2 min, 5个循环; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35个循环。扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 利用割胶回收试剂盒NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up回收目的条带, 与RACE试剂盒中的Lineareized pRACE vector连接, 转化到DH5α感受态细胞中涂布于含有氨苄的选择性培养基上, 37 °C培养16~24 h, 筛选阳性克隆进行测序。选取白斑菌落扩大培养, 利用引物(表1)进行菌液PCR反应, 挑取与目的片段一致的菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。经测序所得3'和5'RACE扩增序列利用

VecScreen软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>)去除载体序列, 利用BioEdit软件进行拼接, 获得*CaMKIV*基因的cDNA全长。

序列分析 在NCBI数据库中利用在线ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)查找开放阅读框(ORF); 使用ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)预测编码蛋白的理化性质; NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)预测蛋白质磷酸化位点; NetNGlyc 1.0Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)预测糖基化位点; Signal 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽序列; 用Phyre 2程序(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)预测蛋白质的二级结构和三级结构; ClustalX软件进行氨基酸序列多重比对; 利用MEGA 6.0软件采用邻接法(Neighbor-Joining method)构建系统进化树, 1 000次Boots-traps, 其他参数均使用默认值。

实时荧光定量PCR 实验前取9只健康的体质量、大小一致的瘤背石磺, 分别取其腹足、背部皮肤、神经节、口器、肠、蛋白腺和肝胰腺共7个组织, 将3个个体做成一个混样, 共3个实验样品组, 用Trizol试剂提取总RNA, 并将其反转成cDNA, -20 °C保存备用。根据*CaMKIV*基因序列设计qRT-PCR引物, 利用在线(<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-tagman-primer-tool>)软件设计引物为*CaMKIV-RT-F*和*CaMKIV-RT-R*(表1)。以18S *rRNA*为内参, qRT-PCR使用

SYBR premix Ex Taq™ II 试剂盒(TaKaRa, 大连)在ABI Q6仪器上进行。实验反应体系为20 μL: Premix Ex Taq™ II(2×) 10 μL、ddH<sub>2</sub>O 7.2 μL、上下游引物(10 mol/L)各0.4 μL、cDNA模板2 μL。采用相对定量算法 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法<sup>[21]</sup>计算CaMKIV基因的相对表达量。基因的相对表达量用平均值±标准误(mean±SE)来表示, 使用SPSS 19.0进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),  $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 CaMKIV cDNA的全长序列

瘤背石磺CaMKIV基因cDNA全长为1 603 bp (GenBank登录号: MH807734), 包括1 032 bp的开放阅读框, 5'非编码区(UTR)共315 bp, 3'非编码区(UTR)共256 bp。3'UTR区含有多聚糖核苷

酸的加尾信号序列AATAAA和Poly(A)尾巴(图1)。在NCBI数据库BLAST比对, 结果显示, 该序列与加州海兔(*Aplysia californica*)的CaMKIV有80%的相似性, 与光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*)的CaMKIV有63%的相似性, 所以命名为Or-CaMKIV基因。

### 2.2 CaMKIV的结构特征

经软件预测结果显示, 该基因序列共编码343个氨基酸, 多肽链原子数量为5 490, 分子量约为3.87 ku, 理论等电点6.12, 分子式为C<sub>1741</sub>H<sub>2768</sub>N<sub>452</sub>O<sub>514</sub>S<sub>15</sub>; 赖氨酸(Lys)、亮氨酸(Leu)、缬氨酸(Val)含量最高, 分别为10.5%、9.6%、8.2%; 组氨酸(His)、半胱氨酸(Cys)、谷氨酰胺(Gln)含量最少, 均为1.7%(表2)。带正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)47个, 带负电荷氨基酸残基(Asp+Glu)51个。脂肪族氨基酸指数93.79,

```

1   ATGGGGGATTACTCATGGCCTCTCGTCAACACGTCATTATCACAAACTAGTCTTTCATT
61  CATGATAAAAATTATGGTGTGAAATGGGGAACAGAGAGAAGGAAAAAATAGCCATA
121 AAGAGATCCAGGGAGAAAAGATTATTTTCTAAAGGACTTTCGTTGCATGGGTTAGGATAT
181 TGAGAGTTTAGCACAAACTTGGACACCTTGTTCAGGGAGAGAAGATACAAATGCCGCTA
241 CTGTATTCTCATGTGCATCGCGCTTCGTGATACAGCCTTCCCCACCCTAGCGCCATGAT
301 TCTTGTTACACAAATGCCTCAGAATATGCAGGAATATTGGATAGCTGAGAGCATAAAG
      M P Q N M Q E Y W I A E S I K
361 GATACAAAATTTGAAGATGTTTATGACCTGGGAAAAGAATTGGGACGTGGTGAACATCA
      D T K F E D V Y D L G K E L G R G A T S
421 GTTGCCATAAATGCTGTGTCAAAGGAAGTCAAGCATGGGCTGTAATAAATGGAC
      V V H K C C V K G T D Q A W A V K I M D
481 AAGCGGTTGAGCTGAAAAGTATTGTGACAGAGATTGGGATTTTGCTCAAGCTCAATCAT
      K R V E L K T I V T E I G I L L K L N H
541 CCTAACATTGTGAGAATGAAAGAGGTGTTGAAACACTGGATCATGACTACATTGTGTTA
      P N I V R M K E V F E T L D H D Y I V L
601 GAACTAGTAACAGGCTCAGAAGTGTGAAAGAATTATCACTCAGGAATATTATTCAGAG
      E L V T G S E L F E R I I T Q E Y Y S E
661 GAGCAAGCAGCCACAGCCATCAGAGACATTATAACAGGGGTAGAATATCTTCACAACCAT
      E Q A A T A I R D I I T G V E Y L H N H
721 GATGTTGTCATCGAGATTGAAACAGAGAACATTTTGTATGAAAGCCTGTCCCTAAAT
      D V V H R D L K P E N I L Y E S L S L N

```

(图1 Fig. 1)

781 TCAAAGTTGAAAATTGCTGATTTTGGCCTCTCAACAATTGTCAGTGGGAAAGTTGCCCTG  
S K L K I A D F G L S T I V S G K V A L

841 ACGACAGTATGCGGAACACCAGGCTATTGTGCACCTGAGGTCTTGAAGGGAGAGAAATAC  
T T V C G T P G Y C A P E V L K G E K Y

901 TTCAAAAGTTGTGACATGTGGAGTGTGGAGTCATAGCATATATTCTGTTGTGTGGATAT  
F K S C D M W S V G V I A Y I L L C G Y

961 GAGCCATTTTATGCCGAAAATGAAGCAACCATGTTCAAAAAAATTCTGAAGGGAGATTAT  
E P F Y A E N E A T M F K K I L K G D Y

1 021 AAATTTGACTCACCATGGTGGGATGATGTCAGTGATAATGCTAAGGATTTGGTGAGAAAA  
K F D S P W W D D V S D N A K D L V R K

1 081 CTGCTAGTGGTGGATCCAAAAAGCGACTGACACCAGCTGCCTTGAAGCATGTGTGG  
L L V V D P K K R L T P A A A L K H V W

1 141 GTGACGGGAATGGCCAACAAGAAAACACAAAAGATGGCACAGTGGAGAAGATCAAGGAA  
V T G M A N K K T H K D G T V E K I K E

1 201 TTCAATGCCAGGAGAAAACCTAAAGTTTGCACCGATGCCCTGAAGGCAGTTGCGGGAGCC  
F N A R R K L K F A T D A L K A V A G A

1 261 ACCAAAAAGATGGATCTCCTGAGTATTCTGAGGCGAATGCTGGGCTGGACACTCCAGA  
T K K M D L L S I L Q A N A G L D T S R

1 341 GATGAAGAGGGAATGGAGATCAACTGAGACGGTGATATTTTGATACATGTAGAAGCAGTA  
D E E G M E I N \*

1 401 AGCTTCATGGAAGCAGATTGAGATCTACAAATGTTTTAAATTTGATATGTATAATTGCA

1 461 CTACATCAAATCTTTGTTTACACCTATAAGATTTTAAAGTGGTTGAAAATAGTGCATCAG

1 501 CAATTGTAGTAAAAACAAGGTTAAAAAATATGCCAAAACATGAAAATATATGATATC

1 561 TTCTATTATTGTA**AATAAA**CCTAATGATCTG**AAAAAAAAAAAA**

图1 瘤背石磺CaMKIV基因的cDNA序列和氨基酸序列

基因编码区用单下划线表示, 非编码区用波浪线表示, 双下划线表示S\_TKc domain催化域保守区, 加粗部分表示信号肽序列, 红色字体表示AATAAA加尾信号和Poly(A)尾巴

Fig. 1 Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of *O. struma* CaMKIV gene

The ORF region is indicated by a single underline, the UTR region is represented by a wavy line, the double underline indicates the S\_TKc domain catalytic domain conserved region, the bold portion indicates the signal peptide sequence, and the putative eukaryotic polyadenylation signal(AATAA) and the Poly(A) tail are showed by the red font

平均疏水指数-0.234。

磷酸化位点分析显示, 该基因编码的蛋白质有33个磷酸化位点, 分别为Thr 14个、Ser 12个和Tyr 7个; 糖基化位点分析显示有4个N糖基化位点; 信号肽预测结果显示, 该氨基酸序列存在1个信号肽, 信号肽的切割位点位于第29号和第30号氨基酸残基之间, 表明N端的信号肽由前29个氨基酸组成。Phyre 2分析表明, CaMKIV肽链的二级结构主要是 $\alpha$ 螺旋(43%)和 $\beta$ 折叠(19%)为主, 其中三级结构预测如图2所示。

### 2.3 同源性分析

为了分析瘤背石磺CaMKIV的进化地位, 根据瘤背石磺CaMKIV的氨基酸序列, 选取了包括瘤背石磺在内的20个物种的20条氨基酸序列, 利用MEGA 6.0构建系统进化树(图3)。进化树结果显示, 在无脊椎动物分类中, 瘤背石磺与加州海兔的进化地位最接近, 其次与光滑双脐螺、福寿螺(*Pomacea canaliculata*)聚为一支, 随后与美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)、长牡蛎(*C. gigas*)、鸭嘴海豆芽(*Lingula anatina*)组成一大支。脊椎动

表 2 瘤背石磺CaMKIV多肽链的氨基酸组分

Tab. 2 Amino acid composition of CaMKIV from *O. struma*

氨基酸 amino acid	含量/(g/N) content	百分比/% percentage	氨基酸 amino acid	含量/(g/N) content	百分比/% percentage
丙氨酸 Ala (A)	26	7.6	亮氨酸 Leu (L)	33	9.6
精氨酸 Arg (R)	11	3.2	赖氨酸 Lys (K)	36	10.5
亮氨酸 Asn (N)	12	3.5	甲硫氨酸 Met (M)	9	2.6
天冬氨酸 Asp (D)	24	7.0	苯丙氨酸 Phe (F)	10	2.9
半胱氨酸 Cys (C)	6	1.7	脯氨酸 Pro (P)	9	2.6
谷氨酰胺 Gln (Q)	6	1.7	丝氨酸 Ser (S)	15	4.4
谷氨酸 Glu (E)	27	7.9	苏氨酸 Thr (T)	22	6.4
甘氨酸 Gly (G)	20	5.8	色氨酸 Trp (W)	6	1.7
组氨酸 His (H)	8	2.3	酪氨酸 Tyr (Y)	13	3.8
异亮氨酸 Ile (I)	22	6.4	缬氨酸 Val (V)	28	8.2

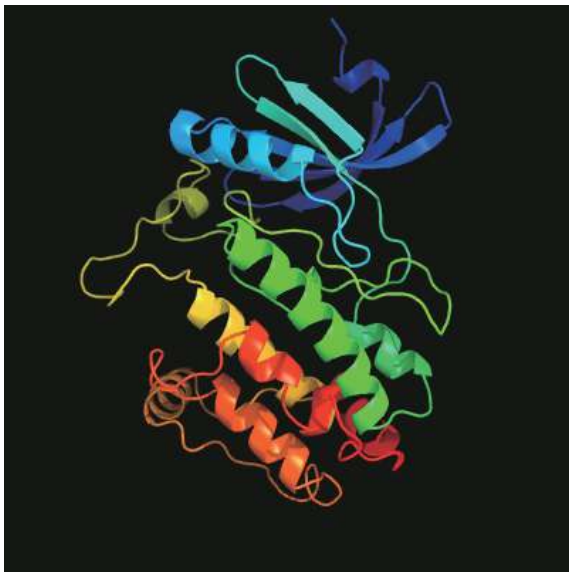


图 2 预测的瘤背石磺CaMKIV三级结构

Fig. 2 Predicted tertiary structures of *O. struma* CaMKIV

物为一大支, 其中包括鱼类、两栖类、鸟类。瘤背石磺CaMKIV的氨基酸序列与其他无脊椎动物的CaMKIV氨基酸序列多重比对发现, 在瘤背石磺CaMKIV的S\_TKc domain催化域保守区其同源性最为相似(图4)。

#### 2.4 不同组织间的差异表达分析

本次实验以18S *rRNA*为内参基因, 利用qRT-PCR检测瘤背石磺CaMKIV基因在腹足、背部皮肤、神经节、口器、肝胰腺、蛋白腺、肠7个组织中的表达。结果显示, CaMKIV基因在各

个组织均有一定的表达量, 其中在腹足中的表达量最高, 其次是口器、背部皮肤, 均显著高于在神经节、肝脏、肠和蛋白腺中的表达量 ( $P < 0.05$ )(图5)。

### 3 讨论

系统进化树结果显示, 瘤背石磺与加州海兔、光滑双脐螺聚为一支, 这与它们在形态学上分类一致, 表明瘤背石磺CaMKIV基因与无壳腹足纲贝类物种的亲缘关系非常接近, 这与Liu等<sup>[22]</sup>研究的结果相符合。这表明含有CaMKIV基因的物种在进化过程中可能具有相似的生理功能。CaMKIV基因对于研究物种的进化提供了基础。CaMKIV基因广泛存在于真核生物的不同组织中, qRT-PCR结果显示, 瘤背石磺CaMKIV基因在腹足中的表达量最高, 腹足由肌肉组织组成, 肌肉组织中含有丰富的肌细胞。瘤背石磺长期生活在潮间带的高潮区域, 通过腹足肌肉收缩进行运动, 以泥土表层的一些底栖藻类为食<sup>[23]</sup>。腹足在运动的过程中会接触各种病原微生物, 王品虹<sup>[24]</sup>研究皱纹盘鲍 (*Apostichopus japonicus*) 肌肉病理学中发现, 当感染急性口围肿胀病时, 其肌肉出现萎缩现象, 表明皱纹盘鲍肌肉参与了免疫调节应答。因此, 腹足的完整性对于滩涂腹足贝类非常重要, 直接影响其生命活动。Gu等<sup>[25]</sup>研究发现, 在促炎因子IFN- $\gamma$ 的刺激下可诱导肌细胞主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)基因、Toll样受

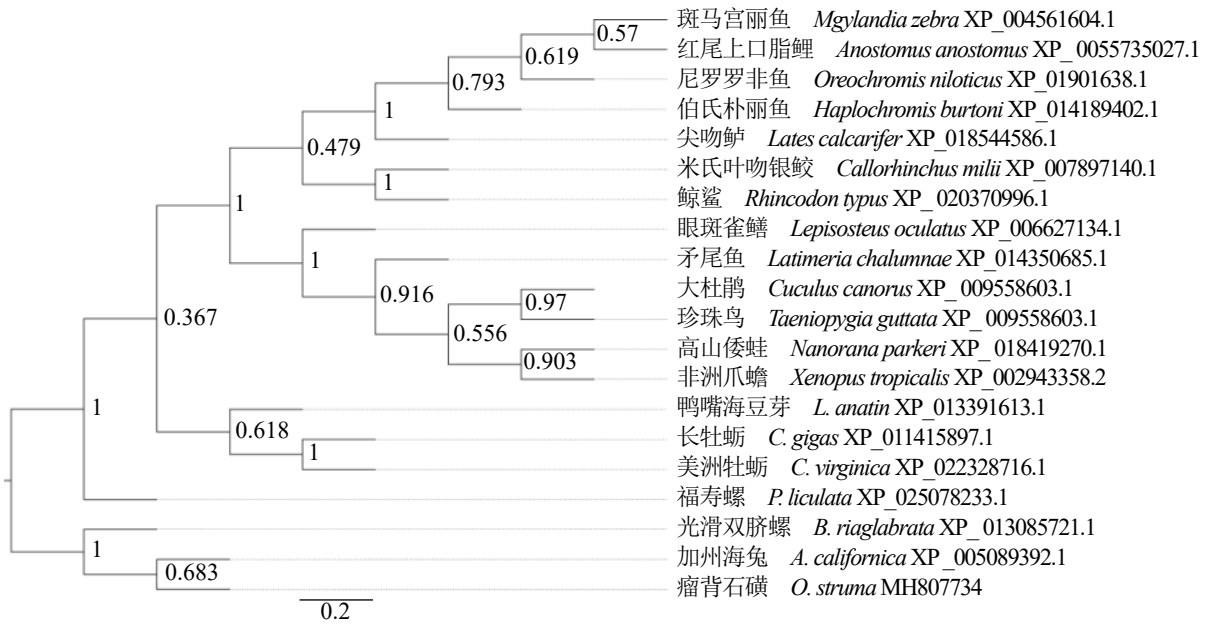


图 3 瘤背石磺CaMKIV氨基酸序列与其他物种的氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *O. struma* CaMKIV amino acid sequence and amino acid sequence of other species

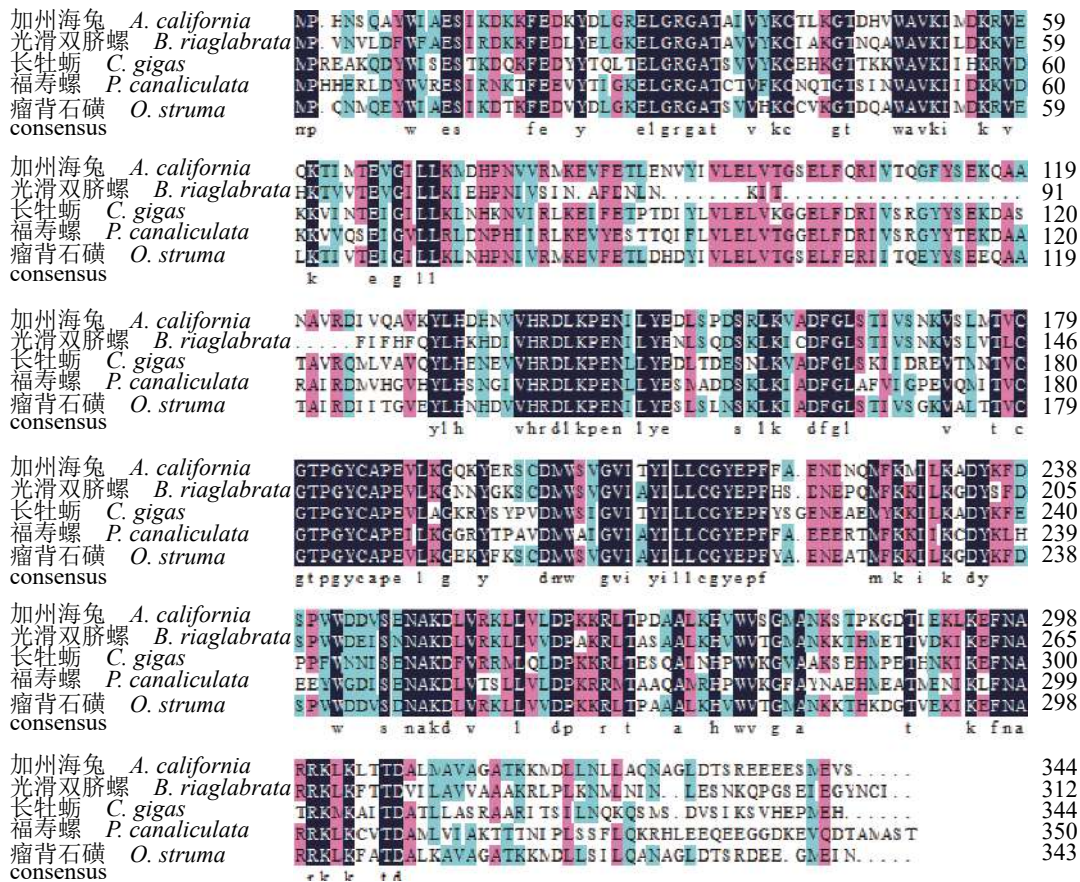


图 4 瘤背石磺CaMKIV和其他贝类物种CaMKIV氨基酸序列的多重比对

粉色表示物种间相似的氨基酸序列；黑色表示物种间高度保守的氨基酸序列；蓝色表示物种间相似的氨基酸序列

Fig. 4 Multiple alignment of *O. struma* CaMKIV and CaMKIV amino acid sequences in other species

Pink indicates similar amino acid, black represents highly conserved amino acid, blue represents similar amino acid among species

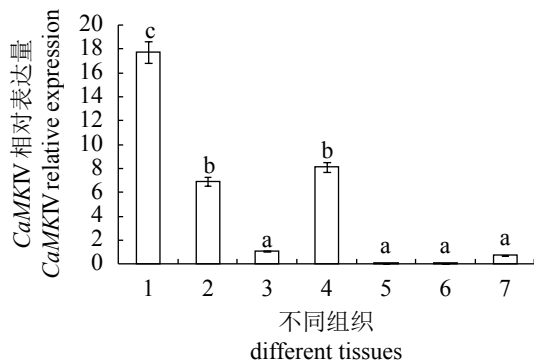


图5 *CaMKIV*基因在瘤背石磺不同组织中的表达情况  
1.腹足, 2.背部皮肤, 3.神经节, 4.口器, 5.肝脏, 6.肠, 7.蛋白腺; 不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Fig. 5 Expression of *CaMKIV* gene in different tissues of *O. struma*

1. pleopod, 2. dorsal skin, 3. ganglion, 4. mouthparts, 5. liver 6. intestines, 7. albumen gland; different letters indicate significant differences ( $P<0.05$ )

体基因、*CaMKIV*的表达量上调, 继而引发机体免疫反应; 而敲除大鼠肌细胞中*CaMKIV*基因后, 在促炎因子IFN- $\gamma$ 的刺激下, 上述基因的表达受到抑制。表明*CaMKIV*参与肌细胞的免疫机能。史丹丹等<sup>[26]</sup>研究发现, 在心脏毒素(cardiotoxin)的诱导下小鼠(*Mus musculus*)肌细胞受损, *CaMKIV*的表达上调, 作为一种免疫因子参与肌肉的炎症反应。*CaMKIV*基因在瘤背石磺腹足中的高表达表明, 该基因可能在防止环境中有害微生物或病毒的入侵方面起关键作用, 目前尚未有关于瘤背石磺免疫机理方面的研究, *CaMKIV*基因在瘤背石磺腹足的免疫应答机制中的作用有待进一步研究。本次实验克隆得到*CaMKIV*基因, 可以为探究瘤背石磺的免疫机理奠定基础, 弥补瘤背石磺免疫应答研究领域的空白。

qRT-PCR结果显示, 神经节组织中*CaMKIV*基因有一定的表达量, 在室内暂养的过程中发现, 瘤背石磺在夜间的活动较白天更为频繁, 这可能是由于*CaMKIV*基因参与神经元的学习记忆功能, 从而可分辨昼夜节律, 但其神经的生理功能机理尚不明确。然而*CaMKIV*基因能够通过钙离子信号的传递与神经元之间完成交流, Kang等<sup>[27]</sup>同样发现, 瘤背石磺*CaMKIV*活动依赖性, 在神经核中对维持和巩固长期记忆具有重要的作用。瘤背石磺的神经节比较简单, 包括

一对脑神经节、一对胸膜神经节和一个脏神经节<sup>[28]</sup>, 这为深入了解*CaMKIV*基因在神经节中的表达提供了基础。

## 4 结论

本实验从瘤背石磺神经转录组数据库中筛选*CaMKIV* unigenes, 进行了cDNA克隆、结构蛋白质结构分析、系统进化树比较以及qRT-PCR表达水平的分析。结果显示, 瘤背石磺*CaMKIV*基因的结构存在4个N-糖基化位点, 对应编码的氨基酸中第23位氨基酸至276位氨基酸之间存在S<sub>1</sub>TKc domain催化域保守区。系统进化树显示, 瘤背石磺*CaMKIV*基因与加州海兔、光滑双脐螺聚为一支, 符合形态学的分类系统。荧光定量表达水平分析显示, *CaMKIV*基因在瘤背石磺各组织中都有表达, 在腹足中的表达量最高, 推测可能参与免疫调节。虽然*CaMKIV*基因在瘤背石磺神经节中的表达量较低, 但为进一步了解瘤背石磺神经结构生理功能的调节以及与*CaMKIV*基因功能研究包括蛋白质印迹法分析其生理功能奠定基础, 更为探究海洋无脊椎动物由海洋向陆地进化过程中对环境适应的调节提供分子依据。

## 参考文献:

- [1] Shen H D, Li K, Chen H C, et al. Experimental ecology and hibernation of *Onchidium struma* (Gastropoda: Pulmonata: Systellommatophora)[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2011, 396(2): 71-76.
- [2] 吴旭峰, 沈和定, 吴文健, 等. 我国华东沿海4种石磺形态学比较[J]. *动物学杂志*, 2010, 45(6): 92-100.  
Wu X F, Shen H D, Wu W J, et al. Comparison on morphology of Onchidiidae in eastern coast of China[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2010, 45(6): 92-100(in Chinese).
- [3] 沈和定, 李家乐, 张缓溶. 石磺的生物学特性及其增殖前景分析[J]. *中国水产*, 2004(1): 60-63.  
Shen H D, Li J L, Zhang H R. Biology characteristics and enhancement foreground of *Onchidium verruculatum* Cuvier[J]. *China Fisheries*, 2004(1): 60-63(in Chinese).
- [4] 倪小英, 应雪萍, 张永普, 等. 不同温度和pH值对瘤背石磺(*Onchidium verruculatum* Cuvier)消化酶活性的影



- 响[J]. 温州大学学报(自然科学版), 2009, 30(2): 1-5.
- Ni X Y, Ying X P, Zhang Y P, *et al.* Effect of different temperatures and pH on digestive enzyme activities of *Onchidium verruculatum* cuvier[J]. Journal of Wenzhou University (Natural Science Edition), 2009, 30(2): 1-5(in Chinese).
- [5] 沈永龙. 盐度对瘤背石磺体组成、消化生理及渗透压调节的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- Shen Y L. Effects of salinities on body composition, digestive physiology and osmoregulation of *Onchidium struma*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [6] 王成暖. 两种石磺的ISSR遗传多样性分析及SSR标记开发[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
- Wang C N. Evaluation of genetic diversity in two Onchidiidae by ISSR and development of SSR[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014 (in Chinese).
- [7] Liu C, Wei L L, Shen H D, *et al.* Complete mitochondrial genome of *Peronia verruculata* (Gastropoda: Pulmonata: Systellommatophora: Onchidiidae)[J]. *Mitochondrial DNA*, 2015, 26(5): 753-754.
- [8] 史艳梅, 等. 瘤背石磺和里氏拟石磺背部皮肤蛋白质组差异分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(4): 1463-1473.
- Shi Y M, Huang X H, Yang T Z, *et al.* Analysis of proteome difference in the back skin of *Onchidium struma* and *Paraonchidium struma*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(4): 1463-1473(in Chinese).
- [9] 杨铁柱, 沈和定, 史艳梅, 等. 瘤背石磺表皮生长因子基因的克隆、结构及进化分析[J]. 海洋科学, 2017, 41(3): 8-16.
- Yang T Z, Shen H D, Shi Y M, *et al.* Molecular cloning and characterization of EGF-like gene in *Onchidium struma*[J]. *Marine Sciences*, 2017, 41(3): 8-16(in Chinese).
- [10] 刘欣, 史艳梅, 王冬凤, 等. 瘤背石磺肌肉生长抑制素基因的克隆及组织表达分析[J]. 水产学报, 2017, 41(5): 658-668.
- Liu X, Shi Y M, Wang D F, *et al.* Cloning and tissue expression analysis of the *MSTN* gene in *Onchidium struma*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(5): 658-668(in Chinese).
- [11] 汤德平, 何雯. 钙调素依赖性多功能蛋白激酶[J]. 生命的化学(中国生物化学会通讯), 1992(5): 18-20.
- Tang D P, He W. Calmodulin-dependent multifunctional protein kinase[J]. *Chemistry of Life (China Biochemistry Association Newsletter)*, 1992(5): 18-20(in Chinese).
- [12] Tokumitsu H, Enslin H, Soderling T R. Characterization of a  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning and expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(33): 19320-19324.
- [13] Ichinose K, Rauen T, Juang Y T, *et al.* Cutting edge: calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV is essential for mesangial cell proliferation and lupus nephritis[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 187(11): 5500-5504.
- [14] Choi Y H, Ann E J, Yoon J H, *et al.* Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV (CaMKIV) enhances osteoclast differentiation via the up-regulation of Notch1 protein stability[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2013, 1833(1): 69-79.
- [15] See V, *et al.* Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons[J]. *Faseb Journal*, 2001, 15(1): 134-144.
- [16] Miyamoto E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus[J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2006, 100(5): 433-442.
- [17] Naz H, Shahbaaz M, Bisetty K, *et al.* Effect of pH on the structure, function, and stability of human calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV: combined spectroscopic and MD simulation studies[J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2016, 94(3): 221-228.
- [18] Jones D A, Glod J, Wilson-Shaw D, *et al.* cDNA sequence and differential expression of the mouse  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase IV gene[J]. *FEBS Letters*, 1991, 289(1): 105-109.
- [19] 杨敬华, 刘秋芳, 等. 镧影响大鼠海马CaMKIV、CREB磷酸化和BDNF基因表达的研究[J]. 毒理学杂志, 2010, 24(04): 263-267.
- Yang J H, Cai Y, Liu Q F, *et al.* Study of the effects of lanthanum on hippocampal CaMKIV, CREB phosphorylation and BDNF expression in rats[J]. *J Toxicol*, 2010, 24(04): 263-267(in Chinese).

- [20] Lalitha S. Primer premier 5[J]. *Biotech Software & Internet Report*, 2000, 1(6): 270-272.
- [21] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [22] Liu C, Shen H D, Zhou N. Complete mitochondrial genome of *Platevindex* sp. (Gastropoda: Pulmonata: Systellommatophora: Onchidiidae)[J]. *Mitochondrial DNA Part A*, 2016, 27(2): 918-920.
- [23] 王金庆, 成永旭, 吴旭干, 等. 瘤背石磺的形态、习性和生殖行为[J]. *动物性杂志*, 2005, 40(1): 32-40.  
Wang J Q, Cheng Y X, Wu X G, *et al.* Morphological characteristics, living habitus and reproductive behavior of *Onchidium struma*[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2005, 40(1): 32-40(in Chinese).
- [24] 王品虹. 刺参急性口围肿胀病和皱纹盘鲍肌肉萎缩症的病理学研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2007.  
Wang P H. Pathological studies on acute peristome edema disease in sea cucumbers [*Apostichopus japonicus* (Selenka)] and muscle atrophy disease of abalones (*Haliotis discus hannai*)[D]. Qingdao: Graduate School of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanography), 2007 (in Chinese).
- [25] Gu R, Ding M, Shi D, *et al.* Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV mediates IFN- $\gamma$ -induced immune behaviors in skeletal muscle cells[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 46(1): 351-364.
- [26] 史丹丹, 曹永英, 曹标, 等. 钙调蛋白对骨骼肌炎症的干扰效应[J]. *免疫学杂志*, 2016, 32(9): 756-761.  
Shi D D, Cao Y Y, Cao B, *et al.* The interference of calmodulin on skeletal muscle inflammation[J]. *Immunological Journal*, 2016, 32(9): 756-761(in Chinese).
- [27] Kang H, Sun L D, Atkins C M, *et al.* An important role of neural activity-dependent CaMKIV signaling in the consolidation of long-term memory[J]. *Cell*, 2001, 106(6): 771-783.
- [28] Wang D F, Xu G L, Qian J, *et al.* A morphological description of *Onchidium reevesii* (Gastropoda: Eupulmonata: Systellommatophora)[J]. *Molluscan Research*, 2018, 38(3): 218-225.

## Cloning and tissue expression analysis of the calcium/calmodulin dependent protein kinase IV gene (*CaMKIV*) in *Onchidium struma*

LIANG Wei, YANG Tiezhu, SHEN Heding\*, XU Guoli, GU Bingning, XUE Baobao

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education,  
National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Universities Key  
Laboratory of Marine Animal Taxonomy and Evolution, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV (*CaMKIV*) which has multiple physiological functions in organisms, is a regulatory factor widely found in eukaryotes. To investigate the role and molecular mechanism of *CaMKIV* in *Onchidium struma* in the process of evolution from sea to land, and further explain the physiological function of *CaMKIV* to provide a scientific theoretical basis, a series of experiments have been carried out. In this study, the cDNA sequence of *CaMKIV* gene was cloned by RACE-PCR using ganglion of *O. struma*, and bioinformatics analysis and qRT-PCR experiment were performed. The results suggested that the full-length cDNA of *CaMKIV* gene consists of 1 603 base pairs (bp), 315 bp 5' non-coding region (UTR), 256 bp 3' non-coding region (UTR) and 1 032 bp open reading frame (ORF) which encode a total of 343 amino acids. The atom of the polypeptide chain encoded by this gene was predicted. The *CaMKIV* protein was predicted to contain 5 490 atoms, the molecular weight is about 3.87 ku, the theoretical isoelectric point is 6.12, the molecular formula is  $C_{1\ 741}H_{2\ 768}N_{452}O_{514}S_{15}$ , and the N-terminal signal peptide is composed of 1-29 amino acids. The amino acid sequence alignment and phylogenetic tree results suggest that the *CaMKIV* gene was the closest to the *CaMKIV* gene of *Aplysia californica* and *Biomphalaria glabrata*, and its phylogenetic analysis was consistent with the traditional morphological classification. The results of qRT-PCR indicated that the *CaMKIV* gene was expressed in all tissues, and the relative expression in the pleopod was the highest, followed by the dorsal skin and mouthparts, and the expression level in the ganglion, albumen gland, intestine, hepatopancreas and other organs were low. It was preliminarily speculated that the gene played an important role in the ganglion of *O. struma*, or it was the molecular basis for the biological body to perceive external environmental variables. The results of this experiment will provide a theoretical support for further understanding of the regulation of the physiological functions of nervous structure and the function of *CaMKIV* gene, and also provide a reference for exploring the environmental adaptation mechanism of marine animals in the process of evolution from ocean to land.

**Key words:** *Onchidium struma*; *CaMKIV*; gene clone; qRT-PCR; tissue expression

**Corresponding author:** SHEN Heding. E-mail: hdshen@shou.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (41276157); Shanghai University Fisheries Science First-class Subjects Construction Project