



## 刺激隐核虫钙调蛋白基因的分子鉴定

倪炜<sup>1,2</sup>, 张经纬<sup>1</sup>, 余玲莹<sup>1</sup>, 黄晓红<sup>1\*</sup>

(1. 福建师范大学生命科学学院, 福建省发育与神经生物学重点实验室, 福建 福州 350117;

2. 美国佛罗里达大学分子遗传学和微生物学系, Florida Gainesville 32610)

**摘要:** 为了解钙调蛋白在刺激隐核虫生长发育过程中的作用, 实验从刺激隐核虫滋养体 cDNA 文库中克隆出钙调蛋白基因 (*cicam*), 优化密码子后人工合成开放阅读框 (ORF), 构建成重组质粒 pGEX-4T-1/*cicam*, 将其转化至大肠杆菌后, 通过 ZYM-5052 自诱导培养基诱导重组子表达。用谷胱甘肽琼脂糖凝胶及凝血酶纯化重组蛋白 rCiCaM, 并用其免疫小鼠 BALB/c 株获得多克隆抗体。分别用逆转录 PCR 和免疫印迹实验检测 *cicam* 及其编码蛋白 CiCaM 在各期虫体中的表达。通过间接荧光抗体实验检测 CiCaM 在幼虫中的定位。通过覆盖印迹实验 (Blot overlay assay) 初步探讨了重组蛋白 rCiCaM 结合重组肌动蛋白解聚因子的活性。结果显示, *cicam* 的 ORF 为 450 bp, 编码含 149 个氨基酸的肽链, 其分子量预测值为 16.9 ku; 原核表达的融合蛋白 GST-rCiCaM 及切除 GST 标签的 rCiCaM 的表观分子量分别为 43 和 16.9 ku, 均与预测值相符; *cicam* 在刺激隐核虫的各个发育阶段都有稳定的表达, 其表达产物 CiCaM 的分子量与预测值相符; 在幼虫细胞内 CiCaM 在胞质中均有分布, 尤其在 4 个大核周围及胞口部位更为富集; CiCaM 与 CiADF<sub>2</sub> 之间可能发生 Ca<sup>2+</sup> 依赖性的相互作用。该研究丰富了刺激隐核虫病原分子生物学知识, 为刺激隐核虫病防治方法的开发提供参考。

**关键词:** 刺激隐核虫; 钙调蛋白; 克隆; 表达; 分子鉴定

**中图分类号:** Q 71; S 941.51

**文献标志码:** A

刺激隐核虫 (*Cryptocaryon irritans*) 是一种在热带或温带水域中专性寄生于海洋硬骨鱼的纤毛虫类原生动物, 是引起海水养殖鱼类“白点病”的病原, 给海水养殖业造成巨大的经济损失。刺激隐核虫生活史包括滋养体期 (trophonts)、包囊前期 (protomonts)、包囊期 (tomonts) 及幼虫期 (theronts) 4 个阶段。幼虫感染鱼类宿主后, 在鱼的表皮层和真皮层之间发育成滋养体, 成熟的滋养体脱落于海水中形成包囊前期体和包囊<sup>[1-3]</sup>。在养殖密度过高, 海水 pH 值较低, 水体中硝酸盐和磷酸盐过多时, 刺激隐核虫会大量繁殖导致“白点病”暴发。

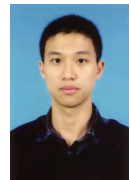
宿主鱼的体表和鳃被大量虫体侵染后, 会分泌过量的黏液, 易导致鱼窒息而死, 另外虫体寄生带来的机械损伤会使宿主的上皮细胞渗透失衡, 间接加大了宿主被其他病原微生物如真菌等二次感染的机会。因此, 在感染后期, 宿主常常出现上皮坏死、表层脱落的症状。已报道的防治刺激隐核虫感染的方法主要有 3 种: ① 用剂量为 0.15~0.30 mg/L 的铜离子盐溶液或低浓度的甲醛水溶液处理水体<sup>[2, 4-5]</sup>; ② 用低盐度的海水 (海水盐度为 16) 养殖约 14 d 再将水体盐度逐渐回升至初始值<sup>[3, 6]</sup>; ③ 用奎宁类药物如盐酸奎宁和氯喹二磷酸等处理

收稿日期: 2021-05-01 修回日期: 2021-06-29

资助项目: 国家自然科学基金 (31672244); “十三五”海洋经济创新发展示范项目 (FZHJ11)

第一作者: 倪炜 (照片), 从事细胞生物学研究, E-mail: weini@ufli.edu

通信作者: 黄晓红, 从事分子寄生虫学研究, E-mail: biohxh@fjnu.edu.cn



水体<sup>[4]</sup>。上述防治方法都存在着不可忽视的缺陷, 如铜离子盐的使用不仅会对肾脏和肝脏造成损害, 还会促进肠道菌群的繁殖, 降低鱼体对其他疾病的抵抗能力; 甲醛水溶液则是公认的致癌物质, 还会影响水体的溶氧量; 奎宁类药物对鱼本身具有一定的毒性, 而且是潜在的致畸和致癌物质。近来, Yin 等<sup>[7]</sup>认为含 74%~78% 的铜合金能有效地杀灭刺激隐核虫, 从而达到预防该虫暴发流行的目的; 免疫预防相关研究也有报道<sup>[8-10]</sup>。然而目前尚无行之有效的预防和治疗“白点病”的方法, 因此, 对刺激隐核虫病原分子生物学的探究尤为必要。

钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 作为真核细胞中最普遍的钙离子流 (Calcium, Ca<sup>2+</sup>) 感受器, 是触发 Ca<sup>2+</sup> 信号通路的中间媒介, 其通过传导第二信使 Ca<sup>2+</sup> 的信号, 参与细胞生长、增殖和与运动相关的多种分子、生化调控<sup>[11-13]</sup>。如溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*) 入侵宿主组织过程中相关的运动、黏附、细胞溶解和吞噬作用等都与 Ca<sup>2+</sup> 信号有关<sup>[14]</sup>。CaM 是目前被研究的最为广泛的 E-F-hand 家族蛋白, 研究已经深入至囊泡运输、细胞分裂增殖以及纤毛或鞭毛的运动等多个方面。在恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 和岗地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 中, 已发现钙调蛋白样分子的活性与虫体的运动和对宿主的入侵有关<sup>[15-16]</sup>。但尚未有关于 CaM 在刺激隐核虫生长发育和入侵宿主中作用的研究。

因此, 本实验对刺激隐核虫钙调蛋白基因 *cicam* 进行了克隆、表达、分子鉴定, 并从 mRNA 转录水平和天然蛋白表达水平 2 个方面探究了 *cicam* 在刺激隐核虫的包囊、幼虫和滋养体/包囊前期期的表达情况, 以及该基因表达产物 CiCaM 在幼虫体内的定位, 这将有助于了解 CiCaM 在刺激隐核虫生长发育中的作用, 为该虫病原生物学的进一步研究提供参考, 同时为“白点病”的防治提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

褐菖鲉 (*Sebastes marmoratus*) [体质量 (100±20) g] (购自福州海产品批发市场) 作为刺激隐核虫实验室传代宿主; 刺激隐核虫虫株由本实验室传代培养<sup>[17]</sup>。BALB/c 小鼠 (*Mus musculus*) (SPF 级,

6 周龄) 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司; 刺激隐核虫滋养体的 cDNA 文库由本实验室构建<sup>[18]</sup>; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 及 BL21 株及质粒 pGEX-4T-1 均来自本实验室库存。

### 1.2 *cicam* 及其编码的氨基酸序列的生物信息学分析

用 BioEdit7.01 等生物信息学分析软件对从刺激隐核虫滋养体 cDNA 文库表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 测序中得到的 *cicam* 的 cDNA 全长序列并进行分析, 确定其开放阅读框 (open reading frame, ORF)。另外, 通过 NCBI 数据库在线工具 blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比较 *cicam* 编码的 CiCaM 与 GenBank 中已知的 CaM 的同源性, 随后选取 10 个代表性物种的 CaM 与 CiCaM 构建系统进化树。建树软件为 MEGA 4.0, 以参数为 Bootstrap, replication=1 000, random seed=8 747 的近邻相接 (Neighbor-joining, NJ) 法建树。同时用 NCBI 数据库中的 CD-search 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对 CiCaM 蛋白的结构、Ca<sup>2+</sup> 结合位点及 E-F hand 结构域进行分析。

### 1.3 *cicam* 开放阅读框中非通用密码子的替换及 DNA 人工合成

由于密码子的歧义性, 刺激隐核虫同模式生物嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 一样采用通用的终止密码子 TAA 和 TAG 编码谷氨酰胺 (Gln)<sup>[9]</sup>。因此, 本实验将原始的 *cicam* ORF 序列中的 TAA 和 TAG 分别替换为 CAA 和 CAG, 并将该序列命名为 *rcicam*。随后将序列信息提交给金斯瑞生物科技有限公司, 委托合成 *rcicam*, 并将其插入到质粒 pUC57 中, 以重组质粒 pUC57/*rcicam* 的形式送回。

### 1.4 *rcicam* 的扩增

根据 *rcicam* 的序列及选择的插入位点设计上下游引物, 委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。引物序列分别是 5'-ACGGATCCATGGCTGATCAATTGA-3' 和 5'-ATCTCGAGTCATTTGGCCATCATC-3' (下划线部分分别为限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 的识别位点)。以重组质粒 pUC57/*rcicam* 为模板, 用上述引物通过 PCR 反应扩增得到两端带有 *Bam*H I 和 *Xho* I 识别位点的 *rcicam*。反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s,

54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用酚氯仿抽提后, 用乙醇沉淀、75% 乙醇淋洗后溶解于去离子水中冻存备用。

### 1.5 表达载体 pGEX-4T-1/rciCam 的构建

参照已有研究<sup>[19]</sup> 构建表达载体, 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 分别对表达载体 pGEX-4T-1 和上述扩增产物酶切, 电泳后切胶回收, 用 DNA 连接酶连接; 将连接产物转化入大肠杆菌 BL21 株的感受态细胞后, 涂布于含氨苄青霉素 (50 μg/mL) 的 LB 固体培养基上, 37 °C 过夜培养。次日, 挑取单菌落于少量 LB 液体培养基中, 37 °C 过夜培养后, 用碱裂解法提取质粒。通过双酶切法及琼脂糖凝胶电泳对重组质粒进行初步鉴定后, 将含重组质粒的菌株通过生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序确认。

### 1.6 重组蛋白 rCiCaM 的表达、提取和纯化

挑取重组子单克隆于少量含氨苄青霉素的 LB 培养基中 37 °C 摇床培养 8 h 后, 以 1 : 100 的比例将上述菌液转接于 ZYM-505 培养基中进一步活化培养过夜; 再按 1 : 100 (体积比) 的比例扩大培养于自诱导培养基 ZYM-5052 (ZYM505 + 0.2% α-lactose) 中 8 h (37 °C); 离心获得的菌体沉淀用 4 °C 预冷的 Equilibrium/Wash 缓冲液重悬并加入溶菌酶 (100 μg/mL)。超声破碎细胞后加入 Triton X-100 (1%), 于冰上静置 1 h 后离心获取上清液。用谷胱甘肽琼脂糖凝胶 (Thermo Scientific Pierce, 美国) 纯化上清液中的 rCiCaM, 获得结合了 GST-rCiCaM 的凝胶后, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次并离心弃上清液, 加入 PBS 及 3 μL 的凝血酶 thrombin (1 unit/μL), 置于旋转仪上 25 °C 混匀 6 h 后, 离心取上清 (含切除了 GST 标签的 rCiCaM), 4 °C 保存备用。

### 1.7 重组蛋白 GST-rCiCaM 和 rCiCaM 的 SDS-PAGE 分析

浓缩胶和分离胶的浓度分别为 3% 和 15%。将大肠杆菌裂解液的可溶相、不可溶相、纯化的重组蛋白 GST-rCiCaM、切除 GST 标签的 rCiCaM 和单独的 GST 分别与等体积的 2×sample buffer 混匀, 沸水中变性 5 min, 迅速置于冰上冷却后上样, 每孔道上样量为 10 μL。电泳条件为每块胶恒定电流 26 mA, 电泳时间约 65 min; 结束后用考马斯

亮蓝 R-250 染色液染色, 经脱色液脱色后, 用凝胶成像仪拍照, 测量并估算目的蛋白的表观分子量。

### 1.8 免疫鼠血清的制备

将纯化的重组蛋白 rCiCaM 用无菌 PBS 透析并调节浓度到 400 μg/mL; 然后将 1 mL rCiCaM 与 1 mL 弗氏完全佐剂 (Sigma, 美国) 充分乳化, 用于腹腔注射 5 只 BALB/c 小鼠 (rCiCaM 注射剂量为 80 μg/只)。以 14 d 为间隔, 加强免疫 2 次, 剂量同上, 但佐剂换成弗氏不完全佐剂 (Sigma, 美国)。末次注射 10 d 后, 对小鼠进行心脏穿刺取血, 室温静置 2 h 后, 900 × g 离心 10 min, 上清即为含抗 rCiCaM 多克隆抗体的小鼠血清。

### 1.9 逆转录 PCR (RT-PCR) 检测 *cicam* 的 mRNA 转录水平

分别收集刺激隐核虫的包囊、幼虫和滋养体/包囊前体, 用灭菌海水和 3% 的 NaCl 洗净后加入 10 倍体积的 TRIzol 试剂 (ThermoFisher Scientific, 美国), 并用注射器反复吸放至虫体细胞完全裂解, 按试剂说明书操作提取总 RNA。以上述各期的总 RNA 为模板, 以 oligo dT-Adaptor 为引物, 按 RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (TaKaRa, 大连) 的操作步骤进行 RT-PCR, 获得相应虫期的单链 cDNA。分别以各虫期的 cDNA 为模板, 用 *cicam* 的特异性引物进行 PCR。反应条件为 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 进行 25 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。以刺激隐核虫肌动蛋白基因 *ciactin* (GenBank 登录号: JN399999) 为内参, 以 5'-ATGGCCGAAGACTACAAGCAG-3' 和 5'-ACCTGAATCAGTCCATGT-3' 为引物进行 PCR<sup>[19]</sup>。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验各虫期的 *cicam* 和 *ciactin* 的扩增结果。为便于比较, 将相同模板但分别扩增的 *cicam* 和 *ciactin* 产物等体积混合后上样于同一个泳道。

### 1.10 蛋白质印迹法 (Western blot) 分析

将刺激隐核虫包囊、幼虫和滋养体/包囊前体的虫体裂解液进行 SDS-PAGE 后, 用半干式转印电泳仪 (ATTO, 日本) 将凝胶上的蛋白转印至 PVDF 膜 (Millipore, 美国) 上。转印条件为每块胶恒压 5 V, 转印时间为 1 h。转印完成后, 含一套抗原与蛋白标记物的 PVDF 膜用氨基黑 10B 染液染色 5 min 后脱色。将其余切割好的 PVDF 膜用封闭液 (含 3% 脱脂奶粉的 PBS) 室温下振荡封闭



1 h。然后分别与 rCiCaM 免疫鼠血清和 GST 免疫鼠血清 (1 : 100 稀释于封闭液中) 37 °C 孵育 1 h, 经 PBS 洗膜后, 用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (Sigma, 美国) (1 : 2000 稀释于封闭液中) 作为第二抗体, 与 PVDF 膜 37 °C 孵育 1 h; 经 PBS 洗膜后, 将其浸泡在底物溶液 (含 0.05 mg/ml DAB 及 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 PBS) 中显色, 用超纯水终止反应, 室温晾干后拍照避光保存。

### 1.11 免疫荧光抗体实验 (IFAT)

经 0.5 % 的甲醛溶液固定孵出 2 h 内的幼虫 30 min 后用蒸馏水洗虫体 3 次, 并通过 PBS 调节密度至每滴 100 只幼虫。将幼虫滴在盖玻片上后自然风干。rCiCaM 免疫鼠血清用 IFAT 稀释液 (含 3% 胎牛血清的 PBS) 以 1 : 100 稀释后, 均匀滴加到虫体上, 37 °C 孵育 1 h, 对照组滴加相同稀释度的 GST 免疫鼠血清; 通过 PBS 漂洗后, 与 Alexa Fluor 488 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (MP biomedical, 美国) (1 : 400 稀释) 在 37 °C 避光孵育 1 h, 再经 PBS 洗后用 DAPI (1 : 4 稀释于 PBS 中) 染核 2 min; 用抗荧光猝灭的 PVP 封片液封片, 用共聚焦显微镜 (Nikon, 日本) 观察结果并拍照。

### 1.12 Blot Overlay 分析

将纯化的 rCiCaM、rCiADF<sub>2</sub> 和 rCiProfilin 分别于 TTBS 溶液 (20 mmol/L Tris-HCl、110 mmol/L 氯化钠、5 mmol/L 氯化镁及 0.1% Tween20) 中透析后测定浓度备用; 裁剪若干 1.5 cm×1.5 cm 的 PVDF 膜, 置于甲醇中浸泡 20 s 后用超纯水振荡清洗, 晾干备用。在实验组的 4 张 PVDF 膜的中央滴加 50 μL rCiCaM 溶液; 在对照组的 2 张 PVDF 膜的中央滴加 50 μL 相同浓度的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液, 晾干备用。取实验组的 2 张及对照组的 1 张点过样的 PVDF 膜, 浸泡于体积比为 5 : 1 : 4 的甲醇/乙酸/超纯水的混合液中 10 s, 再浸泡于甲醇溶液中 10 s, 使蛋白变性, 随后用超纯水漂洗。将上述处理过的 PVDF 膜在封闭液 (含 3% 的脱脂奶粉的 TTBS) 中封闭 1 h 后与 rCiADF<sub>2</sub> 或 rCiProfilin 溶液室温下孵育 1 h, 同时添加 2 mmol/L 的 CaCl<sub>2</sub> 或 5 mmol/L 的 EGTA; 通过 TTBS 洗膜 3 次后与 rCiADF<sub>2</sub> 或 rCiProfilin 免疫鼠血清 (1 : 100 稀释于封闭液中) 孵育 (37 °C) 1 h。洗膜后, 再与 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (1 : 2000 稀释于封闭液中) 孵育 (37 °C) 1 h。洗膜后显色 (底物与 Western blot 实验相同)。

## 2 结果

### 2.1 *cicam* 的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列分析

*cicam* 的 cDNA 序列以及根据纤毛虫密码子偏好性推测的 ORF 编码的氨基酸序列结果显示, *cicam* 的 ORF 由 450 个核苷酸组成, 编码 149 个氨基酸, 其中具有 4 个非通用密码子, 即图中方框标记的 10~12 位、124~126 位、148~150 位及 289~291 核苷酸组成的密码子, 前 3 个均为 TAA, 最后一个为 TAG (图 1)。TAA 和 TAG 在一些纤毛虫中均编码 Gln, 然而在通用密码子中却充当终止密码子, 因此, 为确保 *cicam* 能在大肠杆菌中顺利翻译表达, 在亚克隆前将 *cicam* ORF 序列中的 TAA 和 TGA 分别改为 Gln 的通用密码子 CAA 和 CAG。

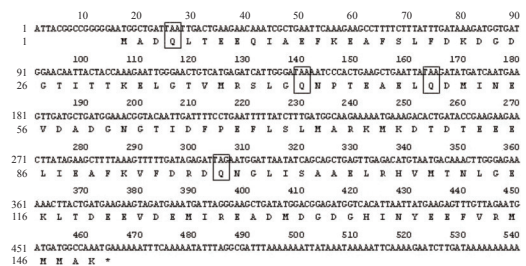


图 1 *cicam* 的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列  
方框内为纤毛虫特有的谷氨酰胺的密码子

Fig. 1 cDNA sequence of *cicam* and its deduced amino acid sequence

The codons inside the boxes encoded Gln in the ciliate

### 2.2 CiCaM 蛋白结构域的分析

CiCaM 的保守结构域分析结果显示, 该蛋白的 N 端和 C 端各有一对典型的 E-F hand 结构域, 它们通过一段短肽相连。2 对 E-F hand 分别位于氨基酸序列的 12~74 和 84~147 这 2 个区段, 其中 4 组氨基酸, 即① 21-Asp、23-Asp、25-Asp、32-Glu; ② 57-Asp、59-Asp、61-Asn、68-Glu; ③ 94-Asp、96-Asp、98-Asn、105-Glu; ④ 130-Asp、132-Asp、134-Asp、141-Glu, 构成了 CiCaM 蛋白的 4 个 Ca<sup>2+</sup> 的结合位点 (图 2)。

### 2.3 CiCaM 的系统进化分析

选取来自毛果杨 (*Populus trichocarpa*)、玉蜀黍 (*Zea mays*)、日本柳杉 (*Cryptomeria japonica*)、人 (*Homo sapiens*)、巨藻 (*Macrocystis pyrifera*)、芬地亚历山大藻 (*Alexandrium fundyense*)、浮萍棘尾

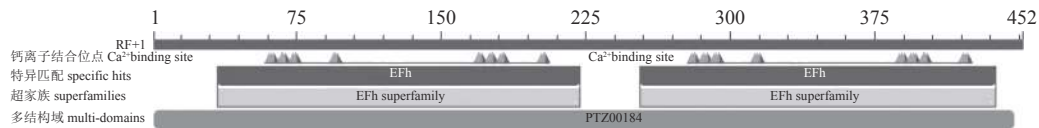


图2 CiCaM的结构域分析

EFh 即 E-F hand 结构域

Fig. 2 Analysis of CiCaM conserved domains

EFh represents E-F hand domain

虫 (*Stylonychia lemnae*)、第四双小核草履虫 (*Paramecium tetraurelia*)、嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 及多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*) 的 CaM, 与 CiCaM 通过 MEGA 4 构建系统进化树。结果显示, 在主要的 2 个进化枝中,

CiCaM 和嗜热四膜虫、草履虫、多子小瓜虫等纤毛虫的 CaM 同属一进化分枝, 在系统进化过程中早于另一进化分枝中的被子植物和高等脊椎动物 (图 3)。

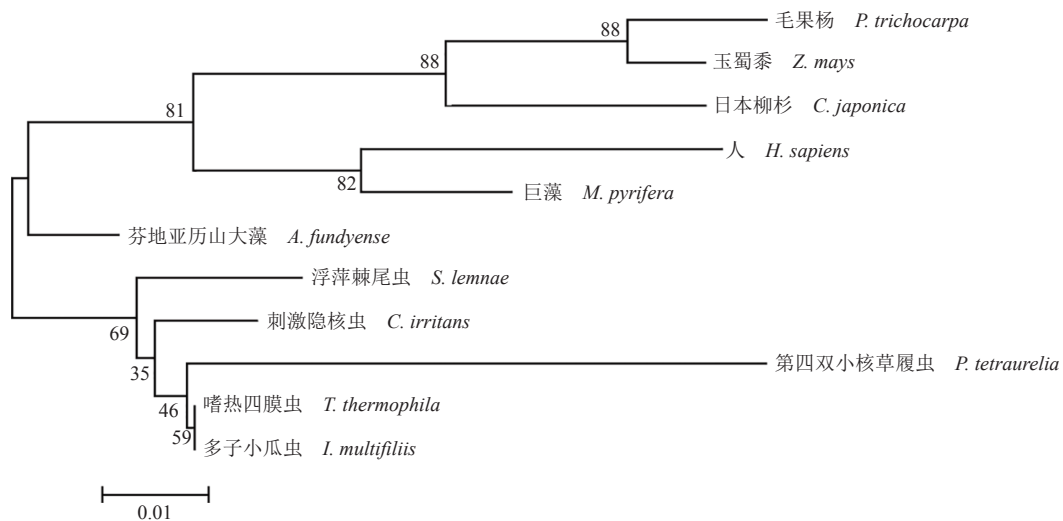


图3 CiCaM 与其他物种的 CaM 的系统进化关系

Fig. 3 The phylogenetic relationship of CiCaM and CaMs from other species

#### 2.4 *cicam* 在刺激隐核虫生活史各阶段的反转录 (RT-PCR) 水平

RT-PCR 的结果显示, 在 400~500 bp 出现一条带, 与 *cicam* 的理论值 (450 bp) 相符, 经测序后证实该条带即为 *cicam* 的扩增产物; *ciactin* 扩增产物的电泳条带也与其理论值 (1131 bp) 相符。结果表明, *cicam* 的表达贯穿刺激隐核虫的整个生活史, 同时 *ciactin* 在各期虫体中均有稳定的表达, 且扩增效果良好, 因此适合作为该实验的内参基因 (图 4)。

#### 2.5 重组蛋白的表达及纯化

为便于纯化重组蛋白, 实验在亚克隆时将合成的 *rcicam* 插入到位于 pGEX-4T-1 载体上编码谷胱甘肽巯基转移酶 (glutathione S-transferase, GST)

的序列之后的多克隆位点中, 使它们处于同一个开放阅读框中, 因此表达出的重组蛋白为带有 GST 标签的融合蛋白。由于融合蛋白中 GST 标签的分子量约为 26 ku, 而 rCiCaM 的分子量经 DNAMAN 7.0 软件预测约为 16.9 ku, 由此可推测出融合蛋白的总分子量约为 43 ku。

重组蛋白表达及纯化的 SDS-PAGE 分析结果显示, 大肠杆菌细胞裂解液的可溶相组分、不溶相组分及纯化后的融合蛋白均在分子量约为 43 ku 的位置出现了一条蛋白迁移带, 其表观分子量与预测值一致。该蛋白条带在可溶相中较不溶相中的粗, 说明重组蛋白 GST-rCiCaM 成功地在大肠杆菌中表达, 在呈现出良好的可溶性的同时, 也有部分以包涵体的形式存在。thrombin 孵育过的重组蛋白中出现一条分子量大小与 rCiCaM 蛋白

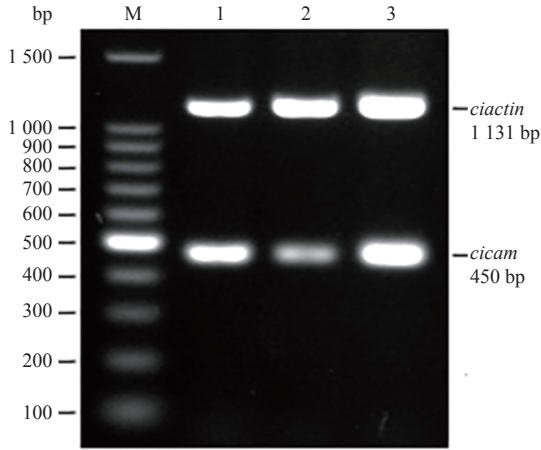


图 4 不同发育阶段刺激隐核虫的 *cicam* 的 PCR 结果  
M. DNA 标准品; 1~3. 分别为包裹、幼虫和滋养体的 *cicam* 和 *ciactin* 的 PCR 扩增产物

Fig. 4 PCR products of *cicam* from different developmental stages of *C. irritans*

M. DNA ladder; 1-3. PCR products of *cicam* and *ciactin* from tomonts, theronts and trophonts/pretomonts, respectively

的理论预测值 16.9 ku 基本相符的蛋白条带, 说明 GST-rCiCaM 的 GST 标签已被 thrombin 成功切除 (图 5)。

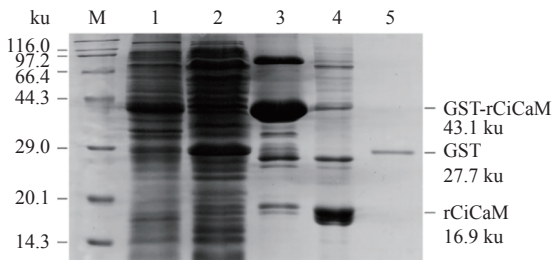


图 5 重组蛋白表达及纯化的 SDS-PAGE 分析

M. 标准分子量的蛋白; 1~2. 分别是大肠杆菌细胞裂解液的可溶相和不溶相组分; 3. 纯化的融合蛋白 GST-rCiCaM; 4. 经凝血酶 (thrombin) 切除 GST 标签的 rCiCaM; 5. 纯化的 GST

Fig. 5 Expression and purification of the recombinant protein analyzed by SDS-PAGE

M. proteins with standard molecular mass; 1-2. soluble and insoluble fractions of bacterial lysate, respectively; 3. purified GST-rCiCaM; 4. purified rCiCaM without GST tag by thrombin; 5. purified GST

2.6 各期虫体内源性 CiCaM 蛋白的表达

Western blot 的结果显示, 刺激隐核虫各期的全虫蛋白中均可见一条表观分子量约为 16.9 ku 的蛋白印记, 这与 CiCaM 的理论值相符, 说明免疫鼠血清中抗 rCiCaM 的多克隆抗体能够特异性识别内源性 CiCaM。该结果还充分说明 CiCaM 在刺激隐核虫生活史的各个阶段均有表达, 与 *cicam*

在各期虫体中的 mRNA 水平的检测结果相符 (图 6)。

2.7 天然 CiCaM 在刺激隐核虫幼虫体内的定位

免疫荧光抗体实验 (IFAT) 结果显示, 当第一抗体是抗 rCiCaM 的鼠血清时, 幼虫的细胞质中呈现出强度不均匀的绿色荧光, 在幼虫的胞口部位及 4 个大核的周围荧光信号特别强; 而以抗 GST 的鼠血清为第一抗体时, 幼虫中则观察不到任何绿色荧光信号 (图版 I)。该结果表明, 天然 CiCaM 广泛分布在刺激隐核虫幼虫的细胞质中, 且明显富集于幼虫的胞口及 4 个大核附近, 此类差异化的聚集现象通常是功能相关的, 即 CiCaM 可能调控着幼虫入侵宿主的进程及与细胞核相关的一系列生理反应。

2.8 Blot Overlay 实验检测 rCiCaM 与 rCiADF<sub>2</sub>、rCiProfilin 之间相互作用

rCiCaM 与 rCiADF<sub>2</sub> 之间的 Blot overlay 实验结果显示, 实验组的 4 张 PVDF 膜上均出现了明显的蛋白印迹, 其中 rCiCaM 在未经变性处理的 PVDF 膜上的蛋白印迹明显深于经变性处理的 PVDF 膜, 而与 2 mmol/L 的 CaCl<sub>2</sub> 或 5 mmol/L 的 EGTA 一同孵育并未对最后的蛋白印记产生明显影响 (图版 II)。另外, 对照组中不论 BSA 变性与否,

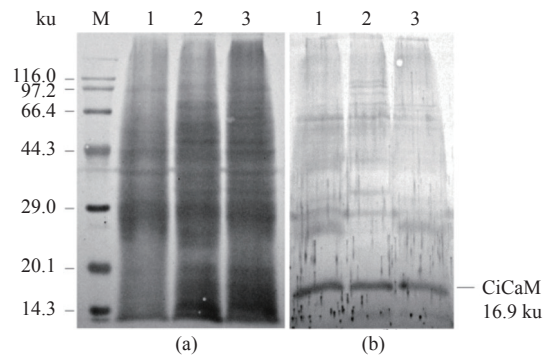


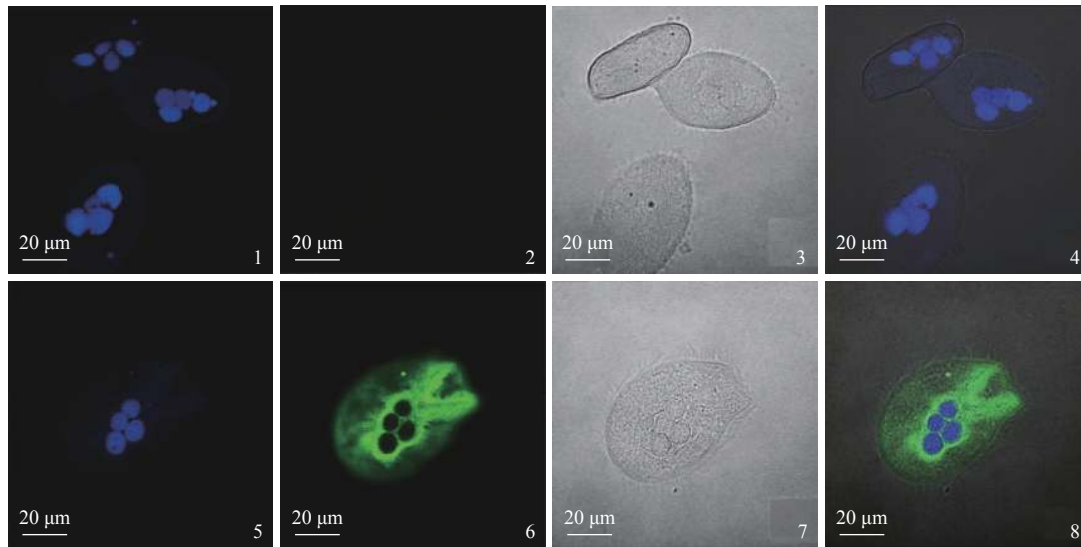
图 6 刺激隐核虫各期虫体的内源性 CiCaM 与抗 rCiCaM 的鼠血清的抗原抗体反应

(a) 刺激隐核虫各期虫体的全虫蛋白经氨基黑 10B 染色的结果; (b) 天然 CiCaM 经 rCiCaM 免疫鼠血清识别的结果; M. 标准分子量的蛋白; 1~3. 样品分别为刺激隐核虫包裹、幼虫和滋养体/包裹前体的细胞裂解液

Fig. 6 Reactions of the endogenous CiCaM from different phases of *C. irritans* to murine sera against rCiCaM

(a) the total proteins from different phases of *C. irritans* stained with amino black 10B; (b) the endogenous CiCaM protein recognized by murine sera against rCiCaM; M. proteins with standard molecular mass; 1-3. cell lysates from tomonts, theronts and trophonts/ pretomonts of *C. irritans*, respectively





图版 I 定位刺激隐核虫幼虫内源 CiCaM 的 IFAT 结果

1~4 的第一抗体为 GST 的免疫鼠血清作为阴性对照, 5~8 的则是 rCiCaM 的免疫鼠血清; 3 和 7 显示明场下的幼虫; 4 为 1、2、3 融合后的图片, 8 为 5、6、7 融合后的照片; 第二抗体均为 Alexa Fluor 488 标记的羊抗鼠 IgG 抗体; 蓝色荧光信号显示 DAPI 染色的细胞核, 绿色荧光信号显示天然 CiCaM 的分布

**Plate I Localization of the endogenous CiCaM in the theronts of *C. irritans* by IFAT**

1-4. the primary antibody was the serum from mouse immunized with GST as negative control, 5-8. the primary antibody was the serum from mouse immunized with rCiCaM; 3 and 7. the theronts under bright field; 4. the image merged from 1, 2 and 3; 8. the image merged from 5, 6, and 7; the second antibody was goat anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor 488; blue fluorescence showed the nuclei stained with DAPI; green fluorescence indicated the distribution of native CiCaM

最后都未出现明显的蛋白印迹。该实验表明, rCiCaM 与 rCiADF<sub>2</sub> 之间能够发生相互作用, 若通过短时间的变性处理破坏 rCiCaM 的构象及活性, 即可能减弱 rCiCaM 与 rCiADF<sub>2</sub> 之间的相互结合。

rCiCaM 与 rCiProfilin 之间的 Blot overlay 实验结果显示, 不论是实验组还是对照组中的 PVDF 膜上均未出现明显的蛋白印迹 (图版 III)。

该结果表明 rCiCaM 与 rCiProfilin 之间可能不存在直接的相互作用。然而与天然蛋白相比, 原核表达的重组蛋白 rCiProfilin 可能缺乏足够的后期修饰, 在空间构象上也难以与天然蛋白保持一致, 因此可能影响了 rCiProfilin 某些结构域功能的发挥, 这也是实验中未观察到蛋白印迹的可能原因之一。

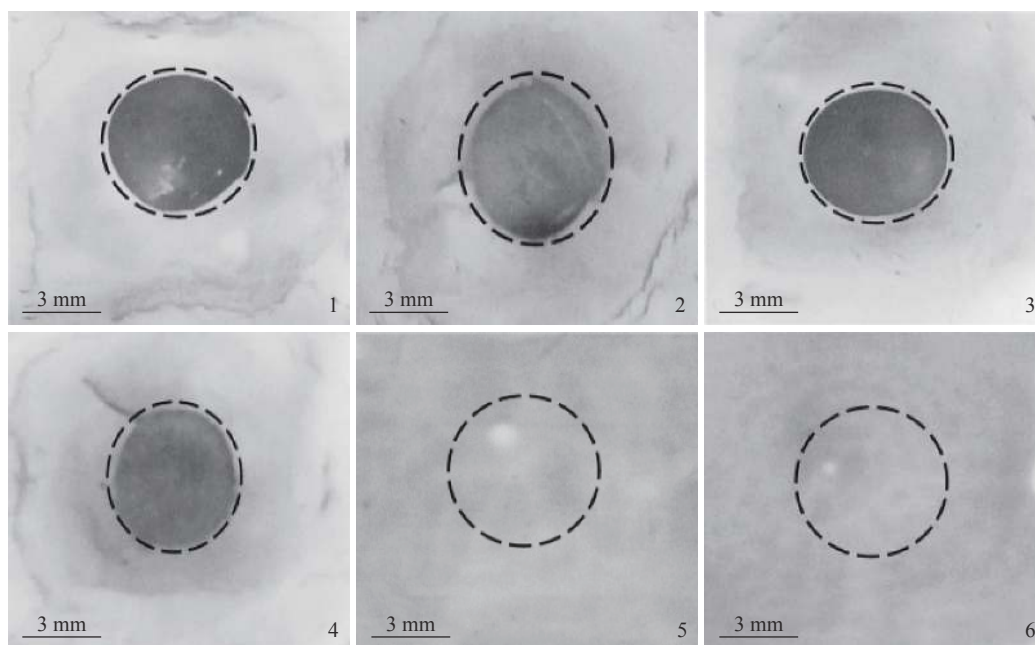
### 3 讨论

刺激隐核虫滋养体 cDNA 文库的构建及 ESTs 的测序<sup>[18]</sup> 等前期工作为 *cicam* 的研究打下了基础。对原始 *cicam* 全长 cDNA 的分析表明, 该基因的开放阅读框中包含 4 个非通用密码子, 即 3 个 TAA 和 1 个 TAG, 且在一些纤毛虫中均编码谷氨酰胺, 而在大肠杆菌中通用密码子则是终止密码

子。因此, 我们通过全基因合成将 *cicam* ORF 中的 TAA 和 TAG 替换成适于在大肠杆菌中翻译的 CAA 和 CAG, 以获得原核表达的 rCiCaM 蛋白用于分子鉴定。

对推演出的 CiCaM 氨基酸序列的分析显示, CiCaM 与典型的钙调蛋白一致, 分别在 N 末端和 C 末端具有 2 对特征结构域——E-F hand, 每对 E-F hand 有 2 个 Ca<sup>2+</sup> 结合位点。CaM 普遍存在于所有真核生物细胞中, 第二信使 Ca<sup>2+</sup> 触发的一系列影响细胞生长、增殖和运动的生理调控, 大多都由中间媒介 CaM 来传递离子信号。刺激隐核虫的感染性幼虫是在包囊经历多次二分裂后孵化出的, 这一过程少不了 Ca<sup>2+</sup>/CiCaM 的参与。另外刺激隐核虫生活史中的成囊和脱囊过程伴随着复杂的肌动蛋白细胞骨架的变化, 而 Ca<sup>2+</sup>/CiCaM 又与许多肌动蛋白结合蛋白 (actin binding proteins, ABPs) 存在密切的相互作用, 因此, Ca<sup>2+</sup>/CiCaM 很可能涉足对成囊、脱囊进程的调控。

CiCaM 分子系统进化的分析显示, 其系统发生上早于被子植物和脊椎动物, 并与其他纤毛虫的 CaM 同属一枝。需要指出的是, 虽然多子小瓜虫与刺激隐核虫在虫体特征、生活史、繁殖模式

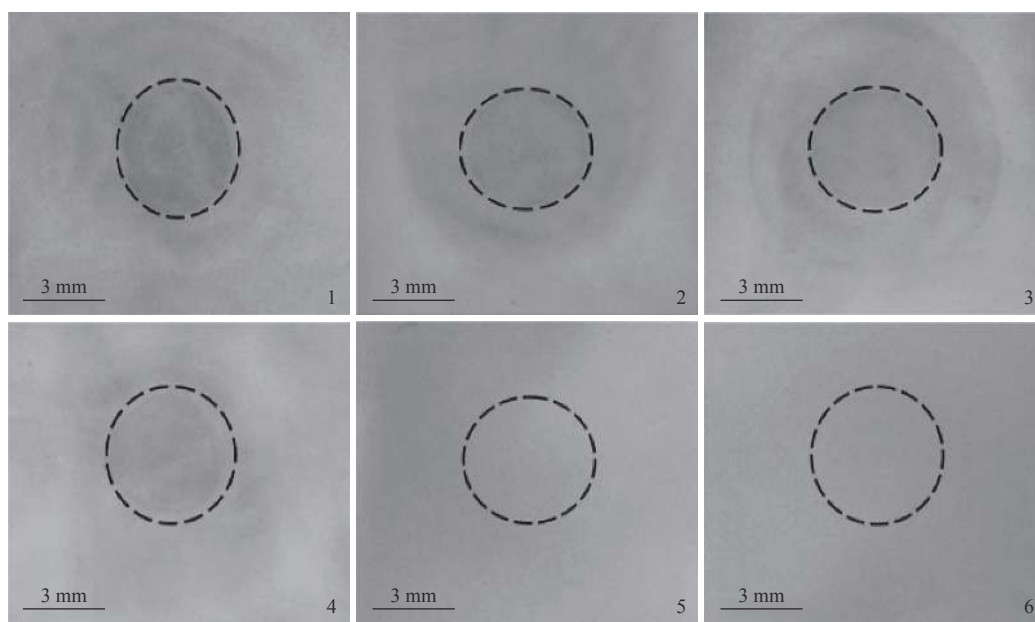


图版 II rCiCaM 与 rCiADF<sub>2</sub> 之间的 Blot Overlay 测试

1~4 为 rCiCaM 与 rCiADF<sub>2</sub> 的 Blot overlay, 5~6 是 BSA 与 rCiADF<sub>2</sub> 的 Blot overlay; 1、3、5 均为未变性的蛋白, 2、4、6 均为部分变性的蛋白; 1 和 2 覆盖时含 CaCl<sub>2</sub>, 3 和 4 覆盖时含 EGTA, 5 和 6 覆盖时含 CaCl<sub>2</sub>; 实验中 BSA 与含 EGTA 的 rCiADF<sub>2</sub> 的实验结果也呈阴性, 故图片省略

**Plate II Blot Overlay between rCiCaM and rCiADF<sub>2</sub>**

1-4. Blot overlay between rCiCaM and rCiADF<sub>2</sub>; 5-6. Blot overlay between BSA and rCiADF<sub>2</sub>; 1, 3 and 5. non-denatured proteins; 2, 4 and 6. partially-denatured proteins; 1 and 2. performed with CaCl<sub>2</sub>; 3 and 4. performed with EGTA; 5 and 6. performed with CaCl<sub>2</sub>; Blot overlay between BSA and rCiADF<sub>2</sub> performed with EGTA showed a negative result (fig not showed)



图版 III rCiCaM 与 rCiProfilin 之间的 Blot Overlay 测试

1~4 为 rCiCaM 与 rCiProfilin 的 Blot overlay, 5~6 为 BSA 与 rCiProfilin 的 Blot overlay; 1、3、5 均为未变性的蛋白, 2、4、6 均为部分变性的蛋白; 1、2、5 和 6 覆盖时含 CaCl<sub>2</sub>, 3 和 4 覆盖时含 EGTA; 实验中 BSA 与含 EGTA 的 rCiProfilin 的实验结果也呈阴性, 故图片省略

**Plate III Blot Overlay between rCiCaM and rCiProfilin**

1-4. Blot overlay between rCiCaM and rCiProfilin, 5-6. Blot overlay between BSA and rCiProfilin; 1, 3 and 5. non-denatured proteins; 2, 4 and 6. partially denatured proteins; 1, 2, 5 and 6 performed with CaCl<sub>2</sub>; 3 and 4 performed with EGTA; Blot overlay between BSA and rCiProfilin performed with EGTA showed a negative result (fig not showed)



及传播途径上极为相似,但是它们的超微结构及分类学研究<sup>[20-21]</sup>表明二者并无明显的亲缘关系,二者之所以表现出如此相近的特征是趋同进化的结果,即在类似的生境下演化出相似的特征。

原核表达的结果显示,自诱导培养基 ZYM-5052<sup>[22]</sup>能为大肠杆菌提供较好的盐离子环境,有助于提高融合蛋白的表达量及可溶性。纯化得到的重组蛋白 GST-rCiCaM 中掺有部分杂带,其中在约 80 ku 处存在一条较明显的条带,可能是某种与融合蛋白 GST-rCiCaM 存在相互作用的蛋白在纯化后被一起洗脱下来。另外,thrombin 能够顺利切除融合蛋白的 GST 标签,这为体外研究 CiCaM 的功能打下了基础。

通过 RT-PCR 实验和 Western blot 分析,我们知道不论是在 mRNA 水平还是在蛋白水平,*cicam* 在刺激隐核虫生活史的各个阶段,即包囊、幼虫和滋养体/包囊前体中均有稳定的表达。同时,在 Western blot 实验中,免疫鼠血清中抗 rCiCaM 的多克隆抗体能与各时期虫体全虫蛋白中的天然 CiCaM 发生特异性的抗原抗体反应,这也表明原核表达的 rCiCaM 具有良好的抗原性,在小鼠体内能激起较强的免疫反应。定位天然 CiCaM 的 IFAT 实验显示,CiCaM 在刺激隐核虫幼虫的胞口部位以及 4 个大核的周围富集。这一方面表明 CiCaM 与核相关的生理调控关系密切,与其他研究中关于 CaM 对细胞分裂及核内其他功能基因表达的影响一致。另一方面,天然 CiCaM 在幼虫胞口附近的聚集说明其与细胞运动有关,可能在幼虫入侵宿主的环节发挥着重要作用,而且我们此前研究的 2 种 ABPs,即 CiADF<sub>2</sub><sup>[19]</sup> 和 CiProfilin,都在相应的天然蛋白定位的 IFAT 实验中被发现富集于幼虫的胞口部位。刺激隐核虫幼虫的口器结构非常复杂,由口乳头、口肋、胞咽器及双动基体口纤毛等组成<sup>[21]</sup>,一方面,CiADF<sub>2</sub> 和 CiProfilin 作为能够调控肌动蛋白纤丝装配的 ABPs,对于胞口结构和功能的维持有着重要的作用,而 CiCaM 也出现在胞口区域,意味着其可能通过传递胞内的 Ca<sup>2+</sup>信号来影响 CiADF<sub>2</sub> 和 CiProfilin 功能的发挥。另一方面,胞口中的许多结构都需要源自口侧双毛基单元的微管来支撑<sup>[21]</sup>,以往对纤毛或鞭毛中心微管对组装的分子机制的研究表明 CaM 参与了中心微管对的组成<sup>[23]</sup>,在具有纤毛或鞭毛的细胞的运动中起着非常重要的作用。

当胞内的 Ca<sup>2+</sup>与钙调蛋白 E-F hands 结构域中的回环结合后,就能引起 CaM 的构象发生巨大变化,X 光衍射及核磁共振的结果都显示 Ca<sup>2+</sup>的

结合引起 E-F hands 结构域中的 2 个  $\alpha$ -螺旋改变彼此的位置形成一个近乎相互垂直的构象,该构象让 CaM 变得更为开放,提高了 CaM 的下游结合能力,此时通过目的蛋白特定的超二级结构域,如 IQ、1-10、1-14、1-16 motif 等,CaM 便能与这些功能蛋白发生相互作用<sup>[24]</sup>。近来有许多文献资料指出 Ca<sup>2+</sup>/CaM 能够调节多种 ABPs 的功能,从而影响了包括聚合、解聚在内的多种肌动蛋白骨架构成方面的活动。这些 ABPs 包括,细丝蛋白 A (Filamin A, FLNa)、Fesselin、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 [PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>]、质膜钙离子 ATP 酶 (PMCA) 以及肌浆球蛋白 (Myosin) 等<sup>[24]</sup>。然而之前尚未有关于 Ca<sup>2+</sup>/CaM 是否能与 ADF<sub>2</sub> 或 Profilin 发生相互作用的研究。

本研究通过 Blot overlay assay 探究了 rCiCaM 与 rCiADF<sub>2</sub>、rCiProfilin 之间可能存在的相互作用。结果显示,rCiCaM 与 rCiADF<sub>2</sub> 之间可发生较明显的相互作用,并呈现出明显的 Ca<sup>2+</sup>依赖性。而变性破坏了 rCiCaM 空间构象和活性,会导致二者的结合明显下降。已有的研究<sup>[25]</sup>认为,CaM 氨基酸序列由 9 个保守的甲硫氨酸决定着其下游的结合活性,因此,Ca<sup>2+</sup>结合所带来的构象变化有助于暴露这些甲硫氨酸,从而促进其与目的蛋白的结合,rCiCaM 与 rCiADF<sub>2</sub> 之间的 Blot overlay 分析也说明了这一点。

而 rCiCaM 与 rCiProfilin 之间 Blot overlay 的分析结果并不能说明天然蛋白 CiCaM 与 CiProfilin 之间不可能存在相互作用。与天然蛋白相比,原核表达的重组蛋白 rCiProfilin 可能缺乏足够的翻译后修饰,在空间构象上也难以与天然蛋白保持一致,这些都可能影响 rCiProfilin 某些结构域功能的发挥,有待于今后进一步验证。

*cicam* 的 cDNA 及其编码的氨基酸序列已提交到 GenBank,登录号为 MZ043748。今后对刺激隐核虫中钙调蛋白的研究可着重于 CiCaM 在细胞分裂、肌动蛋白微丝装配及由于 CaM 参与调控微管的装配从而影响纤毛的运动性等方面。我们相信通过深入了解刺激隐核虫中的钙调蛋白在上述几方面的作用,能够给未来“白点病”的防治提供新的病原分子生物学方面的思路。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] Colorni A, Burgess P. *Cryptocaryon irritans* Brown 1951, the cause of 'white spot disease' in marine fish: an

- update[J]. *Aquarium Sciences and Conservation*, 1997, 1(4): 217-238.
- [ 2 ] Noga E J. Fish Disease: diagnosis and treatment [M]. 2nd ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 2010.
- [ 3 ] Gratzek J B, Wolke R E, Shotts E B Jr, *et al.* Aquariology: fish diseases & water chemistry [M]. Blacksburg, VA: Tetra Press, 1992: 105-107.
- [ 4 ] Bassleer G. Diseases in Marine Aquarium Fish: causes, symptoms, treatment [M]. Westmeerbeek, Belgium: Bassleer Biofish, 1996.
- [ 5 ] Untergasser D. Handbook of fish diseases[M]. Neptune, NJ: TFH Publications, 1989: 95, 127.
- [ 6 ] Colomi A. Aspects of the biology of *Cryptocaryon irritans*, and hyposalinity as a control measure in cultured gilt-head sea bream *Sparus aurata*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1985, 1: 19-22.
- [ 7 ] Yin F, Bao P B, Liu X, *et al.* Antiparasitic effect of copper alloy surface on *Cryptocaryon irritans* in aquaculture of *Larimichthys crocea*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(3): e01982-18.
- [ 8 ] Dan X M, Zhang T W, Li Y W, *et al.* Immune responses and immune-related gene expression profile in orange-spotted grouper after immunization with *Cryptocaryon irritans* vaccine[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(3): 885-891.
- [ 9 ] Priya T A J, Lin Y H, Wang Y C, *et al.* Codon changed immobilization antigen (iAg), a potent DNA vaccine in fish against *Cryptocaryon irritans* infection[J]. *Vaccine*, 2012, 30(5): 893-903.
- [10] Mo Z Q, Xu S, Cassidy-Hanley D M, *et al.* Characterization and immune regulation role of an immobilization antigen from *Cryptocaryon irritans* on groupers[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 1029.
- [11] Saimi Y, Kung C. Calmodulin as an ion channel subunit[J]. *Annual Review of Physiology*, 2002, 64: 289-311.
- [12] Mikhaylova M, Reddy P P, Munsch T, *et al.* Calneurons provide a calcium threshold for trans-Golgi network to plasma membrane trafficking[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(22): 9093-9098.
- [13] Plattner H. Calcium regulation in the protozoan model, *Paramecium tetraurelia*[J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2014, 61(1): 95-114.
- [14] Babuta M, Bhattacharya S, Bhattacharya A. *Entamoeba histolytica* and pathogenesis: a calcium connection[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(5): e1008214.
- [15] Vaid A, Thomas D C, Sharma P. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-PfPKB signaling pathway in erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(9): 5589-5597.
- [16] Long S J, Brown K M, Drewry L L, *et al.* Calmodulin-like proteins localized to the conoid regulate motility and cell invasion by *Toxoplasma gondii*[J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(5): e1006379.
- [17] 孙志宇, 郑昌峰, 武晓燕, 等. 福建霞浦海区刺激隐核虫虫株鉴定及生活史观察[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2011, 27(2): 101-108.
- Sun Z Y, Zheng C F, Wu X Y, *et al.* The Strain and life-cycle of *Cryptocaryon irritans* isolated from *Pseudosciaena crocea* cultured in Xiapu, Fujian[J]. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)*, 2011, 27(2): 101-108 (in Chinese).
- [18] Huang X H, Sun Z Y, Guo G W, *et al.* Cloning and characterization of a surface antigen CiSA-32.6 from *Cryptocaryon irritans*[J]. *Experimental Parasitology*, 2012, 130(3): 189-194.
- [19] Huang X H, Xu Y, Guo G W, *et al.* Molecular characterization of an actin depolymerizing factor from *Cryptocaryon irritans*[J]. *Parasitology*, 2013, 140(5): 561-568.
- [20] Colomi A, Diamant A. Ultrastructural features of *Cryptocaryon irritans*, a ciliate parasite of marine fish[J]. *European Journal of Protistology*, 1993, 29(4): 425-434.
- [21] 黄玮, 马跃, 李安兴. 人工感染的刺激隐核虫各期虫体的超微结构[J]. 水产学报, 2005, 29(5): 635-642.
- Huang W, Ma Y, Li A X. Ultrastructural study on *Cryptocaryon irritans* throughout the life cycle of artificially infecting *Trachinotus blochi*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(5): 635-642 (in Chinese).
- [22] Studier F W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures[J]. *Protein Expression and Purification*, 2005, 41(1): 207-234.
- [23] Wargo M J, Dymek E E, Smith E F. Calmodulin and PF6 are components of a complex that localizes to the C1 microtubule of the flagellar central apparatus[J]. *Journal of Cell Science*, 2005, 118(20): 4655-4665.
- [24] Tidow H, Nissen P. Structural diversity of calmodulin binding to its target sites[J]. *The FEBS Journal*, 2013, 280(21): 5551-5565.
- [25] Vogel H J, Zhang M J. Protein engineering and NMR studies of calmodulin[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1995, 149(1): 3-15.

## Molecular identification of a calmodulin gene from *Cryptocaryon irritans*

NI Wei<sup>1,2</sup>, ZHANG Jingwei<sup>1</sup>, YU Lingying<sup>1</sup>, HUANG Xiaohong<sup>1\*</sup>

(1. Fujian Key Laboratory of Developmental Biology and Neuroscience, College of Life Science,  
Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China;

2. Department of Molecular Genetics and Microbiology, University of Florida, Gainesville 32610, USA)

**Abstract:** *Cryptocaryon irritans* is a parasitic ciliate causing ‘white spot disease’ on marine teleosts that often results in huge financial losses to mariculture. So far, there is no safe and effective method to control the parasite infection. Calmodulin (CaM), as a sensor for Ca<sup>2+</sup> signaling, regulates cell movement, cell division and invasion of some protozoan parasites to their hosts. To understand the role of calmodulin in the growth and development of *C. irritans*, the calmodulin gene (cicam) was cloned from the *C. irritans* trophozoite cDNA library, and the open reading frame (ORF) was synthesized after codon optimization. The recombinant plasmid pGEX-4T-1/cicam was constructed, then transformed into *Escherichia coli* and induced its recombinant expression with ZYM-5052 self-inducing medium. The recombinant protein rCiCaM was purified by glutathione agarose gel and thrombin, and obtain polyclonal antibodies by immunizing with the mouse BALB/c strain. The expression of cicam and its encoded protein CiCaM in each stage of the worm was examined by reverse transcription PCR and immunoblotting assay, respectively. The localization of CiCaM in the larvae was examined by indirect fluorescent antibody assay. The activity of recombinant protein rCiCaM binding recombinant actin-depolymerizing factor was initially investigated by blot overlay assay. The results showed that the open reading frame (ORF) of CiCaM was 450 bp, which encoded a polypeptide of 16.9 ku, consisting of 149 amino acids; the molecular masses of GST-rCiCaM and rCiCaM were 43 ku and 16.9 ku respectively, which corresponded with the predicted ones; the CiCaM gene expressed in all developmental stages of *C. irritans*, and the molecular mass of the native CiCaM corresponded to the predicted value; the CiCaM distributed all over the cytosol of *C. irritans* theronts, especially abundant around the four macro nuclei and the peripheral area of cytostome; rCiCaM could interact with rCiADF2 in a Ca<sup>2+</sup>-dependent way. This study enriched the knowledge of molecular biology of the pathogen *C. irritans*, which would provide a reference for the prevention and control of cryptocaryonosis.

**Key words:** *Cryptocaryon irritans*; calmodulin; cloning; expression; molecular identification

**Corresponding author:** HUANG Xiaohong. E-mail: biohxx@fjnu.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31672244); Marine Economic Innovation and Development Demonstration Project (FZHJ11)