

## 石磺钙调蛋白 *Os-IP<sub>3</sub>R* 和 *Os-RyR* 基因的克隆、 相对表达量及进化关系

李杰, 许国绿, 沈和定\*, 顾冰宁, 杨铁柱

(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, 上海 201306)

**摘要:** 为明确石磺钙通道蛋白1,4,5-三磷酸肌醇受体(IP<sub>3</sub>R)基因和蓝尼碱受体(RyR)基因的序列和结构信息, 初步研究不同石磺中的 *Onchidium struma-IP<sub>3</sub>R/Onchidium struma-RyR* (*Os-IP<sub>3</sub>R/Os-RyR*) 基因表达量百分比与石磺系统进化的相关性, 实验在瘤背石磺表皮转录组数据库的基础上, 克隆得到2条钙通道蛋白基因 *Os-IP<sub>3</sub>R* 和 *Os-RyR*, 利用生物信息学技术对该基因及所编码蛋白的结构特征进行分析, 并通过qRT-PCR技术分析2个基因在瘤背石磺、平疣桑椹石磺和紫色疣石磺各组织中的表达情况。结果显示, *Os-IP<sub>3</sub>R* 核酸序列为4 574 bp, 包括2 808 bp的开放阅读框, 共编码935个氨基酸, 预测编码的蛋白有6个跨膜区; *Os-RyR* 核酸序列为1 253 bp, 包括1 131 bp的开放阅读框, 共编码376个氨基酸, 预测编码的蛋白有3个跨膜区。将瘤背石磺IP<sub>3</sub>R和RyR的氨基酸序列进行比对, 发现位于钙离子通道区的G\*R\*GGG\*GD序列处高度保守; 发现3种石磺 *Os-IP<sub>3</sub>R/Os-RyR* 的相对表达百分比的高低顺序与各石磺从陆地到浅海的梯度分布趋势相一致, 依次为瘤背石磺>平疣桑椹石磺>紫色疣石磺; 石磺的陆栖性越强, 则 *Os-IP<sub>3</sub>R/Os-RyR* 的相对表达百分比越高。不同种石磺的 *Os-IP<sub>3</sub>R/Os-RyR* 表达量百分比的研究能为分析海洋无脊椎动物由海洋向陆地进化学说提供新的分子生物学线索。

**关键词:** 石磺; *Os-RyR*; *Os-IP<sub>3</sub>R*; qRT-PCR; 表达量百分比

**中图分类号:** Q 785; S 968.2

**文献标志码:** A

石磺科(Onchidiidae)贝类隶属于软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、肺螺亚纲(Pulmonata)、缩眼目(Systellommatophora)、石磺超科(Onchidioidea), 是肺螺亚纲中除耳螺科以外唯一具有自由生活幼虫阶段的种类<sup>[1]</sup>。石磺广泛分布于我国黄海、东海和南海沿岸潮间带或高潮带的岩礁、红树林、芦苇丛等沿岸湿地<sup>[2]</sup>, 我国东南沿海主要分布着4属5种石磺, 其不仅具有两栖性, 并且生存环境由潮间带向潮上带迁移, 呈现出从海洋到陆地阶梯分布的状态<sup>[3]</sup>。近几年, 有关石磺进化研究已经逐步开展, 但进化相关的分子研究仍需深入。不同种石磺为了适应各自的生活环境以及机体功能需求, 在信号转导

通路上也会产生很多精细的分子差异。钙离子介导的信号通路能调节细胞的许多功能<sup>[4-5]</sup>, 而调节Ca<sup>2+</sup>平衡主要依赖于2种钙调控蛋白: 1,4,5-三磷酸肌醇受体(inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, IP<sub>3</sub>R)和蓝尼碱受体(ryanodine receptor, RyR), 这2种钙通道蛋白对维持细胞低Ca<sup>2+</sup>水平和启动瞬时Ca<sup>2+</sup>离子流具有重要作用<sup>[6-8]</sup>。

IP<sub>3</sub>R和RyR是功能相同、结构相似的钙通道蛋白, 有研究表明, IP<sub>3</sub>R和RyR具有共同的单细胞起源, IP<sub>3</sub>R的N端结构域可能由低等生物的RyR进化而来, 并且IP<sub>3</sub>R结合IP<sub>3</sub>的功能不是固有的, 而是由RyR进化来的<sup>[9]</sup>。

在其他模式生物上曾验证RyR和IP<sub>3</sub>R基因的

收稿日期: 2018-01-06 修回日期: 2018-03-18

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

关系,小鼠的RyR和IP<sub>3</sub>R基因约有17%的序列同一性,而且在跨膜区域的序列中,2个基因的序列同一性达到约35%,这也能揭示2个基因起源于同个祖先<sup>[10]</sup>。根据单细胞真核生物和多细胞真核生物中的IP<sub>3</sub>R与RyR的系统发育树可知,IP<sub>3</sub>R起源于RyR。RyR和IP<sub>3</sub>R的功能性基因已经在大量多细胞真核生物中验证过<sup>[11-12]</sup>,同时IP<sub>3</sub>R和RyR也在一些单细胞生物中被发现,比如布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*),克氏锥虫(*T. cruzi*),婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)<sup>[9, 13-14]</sup>。在哺乳动物中RyR存在3种亚型<sup>[15]</sup>,非哺乳的脊椎动物如牛蛙(*Rana catesbiana*)存在2种RyR亚型<sup>[16]</sup>,一些低等的生物就只存在一种亚型的RyR<sup>[17]</sup>,同时在哺乳动物中也验证了存在3种亚型的IP<sub>3</sub>R<sup>[18]</sup>。本实验选择我国沿海比较常见的瘤背石磺(*Onchidium struma*)、平疣桑椹石磺(*Platevindex mortoni*)和紫色疣石磺(*Peronia verruculata*)为研究对象,以瘤背石磺表皮转录组数据库为基础,克隆瘤背石磺IP<sub>3</sub>R和RyR基因的cDNA并命名为*Os-IP<sub>3</sub>R*和*Os-RyR*,分析其在不同石磺各组织中的表达规律和IP<sub>3</sub>R/RyR表达量相对百分比,为研究石磺从海洋到陆地适应性进化提供新的分子依据,并探讨*Os-IP<sub>3</sub>R*和*Os-RyR*的进化关系、丰富IP<sub>3</sub>R和RyR基因的进化信息库数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

采集瘤背石磺(上海崇明北八澳)、紫色疣石磺(广东湛江霞山)和平疣桑椹石磺(福建厦门东海岛),在实验室的仿生态箱中暂养。室温22~24℃,每日定时给石磺投喂玉米粉、清理石磺尸体和排泄物。实验开始前,选取每种石磺3只体型均匀的个体,用超纯水洗净后作为实验材料。

实验室所用的RNA提取试剂盒、Quanti Fast® SYBR® Green PCR试剂盒购自天根生化科技有限公司; pGEM-easy vector购自Promega公司; 琼脂糖、LB培养基、DNA片段纯化试剂盒、三氯甲烷、异丙醇、核酸电泳缓冲液等购自上海生工生物工程有限公司; 2×Taq PCR Mix、DH5-α感受态细胞购自天根生化技术有限公司; RACE试剂盒、反转录试剂盒(RT reagent Kit with gDNA Eraser)购自TaKaRa。

### 1.2 RNA提取与cDNA合成

用灭菌过的解剖剪和解剖刀解剖石磺,获取背部、腹部、腹足、肺囊、神经和心脏各组织,快速将组织置于Trizol试剂中。按照Trizol® reagent操作手册的提取方法提取总RNA,用Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA)检测RNA质量和浓度,并通过琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性,质量良好的RNA于-80℃保存。分别以3种石磺不同组织的总RNA为模板,用SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Japan)按照操作指南合成RACE cDNA第一条链。

### 1.3 *Os-IP<sub>3</sub>R*和*Os-RyR*基因克隆

根据本实验室已有瘤背石磺表皮转录组数据库,找到*Os-IP<sub>3</sub>R*和*Os-RyR*片段序列,在NCBI上进行BLASTx比对验证为IP<sub>3</sub>R和RyR。利用Primer Premier 5.0设计*Os-IP<sub>3</sub>R*引物(表1)和*Os-RyR*引物(表2),并以瘤背石磺的cDNA为模板,扩增目的片段。片段验证的普通PCR扩增体系为30 μL,包括2×Taq Mix 15 μL,上下游引物(10 μmol/L)各0.9 μL, ddH<sub>2</sub>O 12 μL, cDNA 1.2 μL。采用胶回收试剂盒对扩增获得的PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后,割胶回收纯化,并将目的片段与pGEM-easy载体连接构建重组质粒,转化感受态DH5-α大肠杆菌后涂布含氨苄的培养基,37℃培养过夜。经蓝白斑筛选后,将阳性克隆菌液送往上海生工生物工程有限公司进行测序。

设计RACE上游引物3'RACE-F1和3'RACE-F2,然后分别以3'outer primer和3'inner primer为下游引物,3'RACE-cDNA为模板,按照RACE实验说明书进行巢式PCR反应,获得的PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测、割胶回收纯化、连接转化后,挑选阳性克隆菌液送上海生工生物工程有限公司测序。分别将2次测序结果进行拼接,得到*Os-IP<sub>3</sub>R*和*Os-RyR*基因序列,最后通过已经获得的序列设计特异性引物验证全长序列,重测序消除不确定碱基。

### 1.4 序列分析

NCBI在线ORF Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)查找开放阅读框(ORF); 利用Phyre2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)和Pymol软件预测分析蛋白质的二级结构和三级结构; 应用MEGA 6.0软件,构建基

表 1 研究 *Os-IP<sub>3</sub>R* 所用引物Tab. 1 The primer used in *Os-IP<sub>3</sub>R* gene study

引物 primers	5'-3'序列 5'-3'sequence	引物用途 usage
Test-1F	CCAGGCAAACAACCTCTCTCT	片段验证引物
Test-1R	AGCCATCATGCTTGGGCCGCT	片段验证引物
Test-2F	CCAGTCAGACCAACAAAGCCT	片段验证引物
Test-2R	TTTGCTGCCCTGCTCGTCCCT	片段验证引物
Test-3F	GTACTACCACAAACATAACCGC	片段验证引物
Test-3R	CCAATACCTCCCCATTACGC	片段验证引物
Test-4F	ACTGAAACAGCCAATGCCACC	片段验证引物
Test-4R	CAGAACAAAGAGAGTTGGCAG	片段验证引物
3'RACE-F1	ATGTCGGATAAAGCCGCAAAG	3'RACE特异性引物
3'RACE-F2	GCACGCACAAAGGCAACC	3'RACE特异性引物
3'RACE outer primer	TACCGTCGTCCACTAGTGATT	TAKARA试剂盒引物
3'RACE inner primer	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTCACTATAGG	TAKARA试剂盒引物
Os-IP <sub>3</sub> R-F	CGGCAGATGGAACAAACT	荧光定量引物
Os-IP <sub>3</sub> R-R	TTTCTCTCCTTCTCCTCAAC	荧光定量引物
18S Forward primer	CGGCTACCACATCCAAGGAA	荧光定量引物
18S Reverse primer	GCTGGAATTACCGCGGCT	荧光定量引物

表 2 研究 *Os-RyR* 所用引物Tab. 2 The primer used in *Os-RyR* gene study

引物 primers	5'-3'序列 5'-3'sequence	引物用途 usage
Test-1F	GCCACAACGGTATAGATGTAC	片段验证引物
Test-1R	AGAGGAGAAGTTTTATTACCTC	片段验证引物
3'RACE-F1	CATTGTGGATGTGGCTAT	3'RACE特异性引物
3'RACE-F2	CACTACAATGGCAAGCAG	3'RACE特异性引物
3'RACE outer primer	TACCGTCGTCCACTAGTGATT	TAKARA试剂盒引物
3'RACE inner primer	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTCACTATAGG	TAKARA试剂盒引物
Os-RYR-F	CTTCTTGTATCTGCTGTGGTA	荧光定量引物
Os-RYR-R	GCAGTGCTTGAAGCCAATAG	荧光定量引物
18S Forward primer	CGGCTACCACATCCAAGGAA	荧光定量引物
18S Reverse primer	GCTGGAATTACCGCGGCT	荧光定量引物

于最大似然法(maximum likelihood method, ML)的系统进化树, 1 000次bootstraps, 其他参数均为默认值。

### 1.5 荧光定量PCR检测

根据已经获得 *Os-IP<sub>3</sub>R* 和 *Os-RyR* 的 cDNA 序

列, 在基因的序列保守区设计荧光定量PCR引物 *Os-IP<sub>3</sub>R-F*/*Os-IP<sub>3</sub>R-R*(表1)与 *Os-RyR-F*/*Os-RyR-R*(表2), 以18S rRNA为内参, 分别以3种石磺的背部、腹部、腹足、肺囊、神经和心脏组织的cDNA为模板。实时荧光定量PCR采用Quanti

Fast® SYBR® Green PCR试剂盒, 在LightCycler® 480 II型荧光定量PCR仪上反应。三步法PCR扩增反应, 反应体系为10 μL, 包括2×Quanti Fast® SYBR® Green PCR Master Mix 5 μL, Forward primer 0.2 μL, Reverse primer 0.2 μL, ddH<sub>2</sub>O 3.6 μL, cDNA 1 μL。每个样品的目的基因和内参基因分别进行3次技术重复, 反应程序为95 °C预变性30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 32 s, 40个循环。循环结束后, 95 °C 10 s, 60 °C→97 °C, 每 °C采集5次荧光信号。采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析*Os-IP<sub>3</sub>R*和*Os-RyR*基因在不同种石磺各组织中的相对表达量, 并计算*Os-IP<sub>3</sub>R*/*Os-RyR*的相对百分比。

## 2 结果

### 2.1 瘤背石磺*Os-IP<sub>3</sub>R*基因和*Os-RyR*基因的cDNA序列分析

利用RACE技术对3'端未知序列进行扩增, 得到*Os-IP<sub>3</sub>R*核酸序列4 574 bp, 包括1 561 bp的3'非编码区, ORF Finder软件分析获得该序列编码936个氨基酸, 3'UTR区含有典型的加尾信号AATAA和Poly (A)尾巴(图1)。通过NCBI在线数据库的序列比对结果显示, 其与加州海兔(*Aplysia californica*)*IP<sub>3</sub>R*基因的相似度达到85% (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 覆盖区结构域为Ion\_trans domain和RR\_TM4-6 domain。克隆得到*Os-RyR*末端保守区核酸序列1 253 bp, 包括83 bp的3'非编码区, ORF Finder分析该序列编码376个氨基酸(图2)。通过NCBI数据库在线BLAST比对, 发现其与加州海兔RyR末端钙离子通道结构域的氨基酸序列一致性达到94%, 覆盖区结构域也包括Ion\_trans domain (离子通道结构域)和RR\_TM4-6结构域。经Compute pI/Mw ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/))软件分析, 预测瘤背石磺*IP<sub>3</sub>R*蛋白分子量为106.82 ku, 等电点为5.37, 预测瘤背石磺RyR蛋白分子量为44.15 ku, 等电点为4.92。应用TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)在线预测瘤背石磺钙通道蛋白序列跨膜域, 结果表明石磺的*IP<sub>3</sub>R*蛋白有6个预测的跨膜螺旋结构区, 分别为453~475, 485~507, 528~550, 576~598, 619~641, 754~776(图3); RyR蛋白有3个预测的跨膜螺旋结构区, 分别为128~150, 176~198, 256~275(图4)。

通过Clustal Omega(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)进行氨基酸序列在线比对, 发现瘤背石磺RyR和*IP<sub>3</sub>R*具有较高的相似度, 在G\*R\*GGG\*GD区高度保守(图1, 图2), 在家兔(*Oryctolagus cuniculus*)、人(*Homo sapiens*)以及赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)等物种的RyR和*IP<sub>3</sub>R*的蛋白质离子通道结构域中也有相同特点(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=E3NEA8YM013&mode=all>)。

通过Phyre2程序构建瘤背石磺*IP<sub>3</sub>R*和RyR的蛋白质三级结构图, 再经Pymol软件标注和比对。*IP<sub>3</sub>R*二级结构主要包括 $\alpha$ 螺旋和无规则卷曲, 三级结构中预测的离子通道的氨基酸位点为519~786(图5); RyR二级结构主要包括 $\alpha$ 螺旋和无规则卷曲, 三级结构中预测的离子通道的氨基酸位点为131~284(图6)。

### 2.2 *Os-IP<sub>3</sub>R*和*Os-RyR*基因编码的氨基酸序列同源性分析

运用ML法构建瘤背石磺*IP<sub>3</sub>R*氨基酸序列与非洲爪蟾(*Xenopus tropicalis*)、加州海兔、小鼠(*Mus musculus*)、人和加州双斑蛸(*Octopus bimaculoides*)等动物的17条*IP<sub>3</sub>R*序列(表3)的系统进化树分析结果显示, 无脊椎动物和脊椎动物分为2支, 瘤背石磺和光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*)的*IP<sub>3</sub>R*聚类成为一支, 然后与加州海兔聚为一支, 随后这个分支再和加州双斑蛸聚类。脊椎动物中的多种鸟类聚为一支, 哺乳类聚为一支, 黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)和豆荚草盲椿(*Lygus hesperus*)形成一个独立的分支(图7)。

瘤背石磺RyR氨基酸序列与人、牛(*Bos taurus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)和小鼠等动物的14条RyR序列(表4)的系统进化树显示, 无脊椎动物和脊椎动物分为2支, 光滑双脐螺和瘤背石磺的RyR聚为一支(图8)。以*IP<sub>3</sub>R*和RyR编码的氨基酸序列为参考, 瘤背石磺和光滑双脐螺的进化关系较为接近。

### 2.3 *Os-IP<sub>3</sub>R*和*Os-RyR*基因在不同种石磺中的组织表达量分析

*Os-RyR*基因在3种石磺的大部分组织中都有表达, 紫色疣石磺相较于其他2种石磺的*Os-IP<sub>3</sub>R*/*Os-RyR*表达量百分比为最低。*Os-IP<sub>3</sub>R*在平

```

1      gggggcctccaacctggtgattgacctgatcatcaagaacaccagcaacaaagtcttctct
61     ggagactgtggagctgggaattgctttactggaggaggcaacagtaagatccagaatc
121    aatctttcaacgactgaccaacgacaagatgcagacattttcttcaaagtcttcagcga
181    ccgcATGAGAGACGCCAGGCAGAGATCCGGAACACCGTGACGGTCAACACCTCGGACAC
1      M R D A Q A E I R N T V T V N T S D T
241    CGAGAACAGACCACACCGTGAAGAGGAGAAGAAGAAAAAGATTCCCTAGCTACGTTAGA
21     E N R P H R E E E K K K K D S L A T L D
301    CAACCTGCCCTCCCAGTTCGCAGGTTGTCGGAAGCCCACAGATCCGATAGCCCAGTCAA
41     N L P S Q F R R L S E A H R S D S P V N
361    TGATGATCTGCGACACCAGTTGATGAGGCGGCCAGTCAGACCAACAAAGCCTTAAACCA
61     D D L R H Q F D E A A S Q T N K A F N H
421    CGTGCGGCAGGTGCATGGTCGGGAGCCACAGACACCATTGACGGCGGGAGACCAATGA
81     V R Q V H G R G A T D T I D G G E T N E
481    AGATGGAGAGAGCCGACACCACCCAGCAGCAGGAGAGACGAGAGTGAGCGGCCCAA
101    D G E S R H H T Q Q Q A G D E S E R P K
541    GCATGATGGCTCAGATGACAAGAAAATGTCCAGCAAATGCCATTATGAAGCCCATCCT
121    H D G S D D K K M S Q Q I A I M K P I L
601    GCGCTTCTGCAGCTGCTCTGTGAAAACCAACAGAGATTGCAGAACTTCTGCGTAC
141    R F L Q L L C E N H N R D L Q N F L R T
661    CCAGCCCAGTTGCAAGAACCCCAAGCCTGGTGTGTGAGACTTTGACCTTCTGGATTG
161    Q P S C K N P Q N L V C E T L T F L D C
721    TATCTGCGGCAGCACCCAGGCGCCCTGGCCTGCTGGTCTGTACATCAATGAGAACAA
181    I C G S T T G G L G L L G L Y I N E N N
781    CGTGGACCTCATCAACCAAGCCTTGACCAGCTGACCGAGTACTGCCAGGGCCATGCCA
201    V D L I N Q A L T T L T E Y C Q G P C H
841    TGAGAACCAGAATGCCATAGCCATGCACGAGAGCAACGGCATCGACATCATTGTGCCCTT
221    E N Q N A I A M H E S N G I D I I V A L
901    GCTGCTCATTGAGATCAAGTCTTTGGCAAGAACCGCATTGATCTAGTCTGGAAGTAA
241    L L I E I K S L G K N R I D L V L E L K
961    GAACAATGCATCCAAGTGTGCTGGCCATAATGGAGAGTCGGCACGACAGCGAGAACGC
261    N N A S K L L L A I M E S R H D S E N A
1 021  CGAGAGAATTCTCAGCAACATGAGGACCAACAGCTGATGGATATTGCTATCCAAGCCTT
281    E R I L S N M R T K Q L M D I A I Q A F
1 081  CCACTCGGAGGATCCGGGCAAAGATGACAGCACCCACTATGACATCGACGAGGATGA
301    H S E D P G K D D S T H Y D I D D E D D
1 141  CCGTATAGAGGAGAACAACACATCGCCCAAGGCTGTGGGCCACAACATCTACATTCTGGC
321    G I E E N N T S P K A V G H N I Y I L A
1 201  TCACCAGCTGTCCCAACAACAGAGAGCTGGCTGACATGCTGCGACCTGGAGGCTGTGA
341    H Q L S Q H N R E L A D M L R P G G C D
1 261  CCTATTTGGGGACCAGCCTTGAGTACTACCACAAACATACCGCTCAGATTGAAATGT
361    L F G D Q A L E Y Y H K H T A Q I E I V
1 321  GCGGCAGGACCGACCATGGAGAGGATTGTCTTCCCATCCCTGAGATCTGTGAGTATCT
381    R Q D R T M E R I V F P I P E I C E Y L
1 381  GACCAAGGAGACCAAGCTCAATGTCTTCAAGCGTGACAGAGGGACGACGAGGCGAGCAA
401    T K E T K L N V F K R A E R D E Q G S K
1 441  AGTGGCCGATTCTTTCAGCCGACACAACGAGATGTTTGTGAGATGAAGTGGCAGAAAA
421    V A D F F S R H N E M F S E M K W Q K K
1 501  ACTCCGAATGCAACCGGTGATGTTTTGGTTCAGCAGTCACATGGGCCTGTGGAACAGCAT
441    L R M Q P V M F W F S S H M G L W N S I
1 561  CTCCTTACGCTGTGCGGTATCATCAACCTCATGGTGGCTATTTCTACCCCTACAACAC
461    S F S C A V I I N L M V A I F Y P Y N T
1 621  ACTAGACTTCCATTCTGTCGGTGTTCGCTTCAATGGTTTGTGTTGGGGAGCAGTGATGAT
481    L D F H S V G V R F N G L L W G A V M I
1 681  CTGTACAGCTGTGGTGGTCTTCTTCCCTCATCCAATGGGATTCAAGCGTTACTGGCCTC
501    C T A V V V F F P H P M G F K T L A S
1 741  CATCATTCTGAGATTGTGTACTTTTGGGTTAAGGGTGACGCTGTTCTGCTGGGGTT
521    I I L R F V C T F G L R V T L F L L G L
1 801  GCTCAATCTGATCAACAAGTTTGTGTTTATGATCAGCTTGTGGGTAACCGAGGTGTGCT
541    L N L I N K F V F M I S L L G N R G V L
1 861  GATCAAGCCTGTCAATGAGATTCTGTCTGACTTGACATGGTTTATCACATTGGCTACTT

```

(图 1 Fig. 1)

```

561      I K P V N E I L S D F D M V Y H I G Y F
1 921    CGTCCTGTGTGCCCTGGGCTTCTTCTGGCAGGAGTTCTTCTCAGTCTGTTGCTGCTTGA
581      V L C A L G F F W H E F F F S L L L L D
1 981    TGTGGTCTACCGAGAAGAAACATTACTCAATGTCATCAAGTCGGTACCAGGAACGGTGC
601      V V Y R E E T L L N V I K S V T R N G R
2 041    CTCCATCCTCCTCACCAGTGTCTGGCTGTCATTCTCATCTATCTTCTCCATCATCGG
621      S I L L T T V L A V I L I Y L F S I I G
2 101    CTTTCATCTCCTCCAAGATGACTTCTGATGGAGGTGGAGCCGAGTCGGTGCCTCAGCT
641      F I S F Q D D F L M E V E P Q S V P Q L
2 161    CAGCACAGCTGATATCAACATCACTGAAACAGCCAATGCCACCTCCTGCCCGGAGATGG
661      S T A D I N I T E T A N A T S C P A D G
2 221    AACAACTGCACAGAGACCAGGAGTCTACATCTCACAGATTCTGCACAGTCCGGACTG
681      T N C T E T Q E S Y I S Q I L H S A D W
2 281    GATGCAGACGGAGGTTGAGGAGGAAGGAGAGAAAAATGCGTGCCTGCGACTCTCTGATCAT
701      M Q T E V E E E G E K M R A C D S L I M
2 341    GTGTATCATCACCAGCATTAAACCAAGGCCTGCGTAATGGGGAGGTATTGGTGATGTTCT
721      C I I T S I N Q G L R N G G G I G D V L
2 401    ACGAAGCTAGCAAGAATGAACCTTTGTTTTGGCCAGAGTGGTCTATGATCTGCTCTT
741      R K P S K N E P L F L A R V V Y D L L F
2 461    CTTTTCATTGTCATCATTATCGTTCTCAATCTCATCTTTGGGTTCATCATTGACACTTT
761      F F I V I I I V L N L I F G V I I D T F
2 521    CGCCGACCTCAGGAGTGAGAAACAGACAAAGATGAGATCTTGAGGAACACGTCGTTTAT
781      A D L R S E K Q T K D E I L R N T C F I
2 581    CTGTGGACTTGACCGTGTACCTTTGACAACCGCTCAGTGACCTTCGAGGACACATCAA
801      C G L D R A T F D N R S V T F E D H I K
2 641    GCACGACACAACATGTGGCACTATCTGTACTTCATCGTCTGGTGCAGAGTCAAAGATCC
821      H E H N M W H Y L Y F I V L V R V K D P
2 701    CACAGAGTTCACAGACCAGAAAGTTATGTGGACGCTATGATTAAGAGCGTAACCTGGA
841      T E F T G P E S Y V D A M I K E R N L E
2 761    GTGGTTCCTCGTATGCGAGCCATGTCTTGGCAGCCGAGGACAGTGGGTGAGCAGAA
861      W F P R M R A M S L A A E D S E G E Q N
2 821    CGAGATCAGAAGTTGCAACAGCAGCTGGACACAACCACCAAACTGGTACAGAAGCTGTC
881      E I R S L Q Q Q L D T T T K L V Q K L S
2 881    GGGGCACTTTCAGAACTCAAGGAACAAATGACAGAGCAGAGAAACAGAAGCAGCGCTA
901      G Q L S E L K E Q M T E Q R K Q K Q R Y
2 941    TGGACTTCTCCAGACCAATCCTGTGCCATGTCCATCCCTGGACAGTTCTGaccatcc
921      G L L Q T N P V P M S I P G Q F *
3 001    tcttgcaccgectacaccaagctcactcacttcatcaagatttctgattatctca
3 061    taatagattttaaaaaatataatattatattatattatcatctcatcttctctgtgatcac
3 121    acaactactgccaactctctttgttctgtgaattgtgtcgtggttctgttttcttttac
3 181    tgtttgtgatattgttgtagagcattgaagttcatcagctggaaccaatgtgctctttt
3 241    gaccgtgctgctactgatttctggcattgactaagagtgagtgatgtgaaacagcatctg
3 301    ttcattagttttaaacacaaattgagtggtttgagacacctgtgggtagctaatgtagc
3 361    agacgaggtgacactagtacacctgccaagttggcagtggtgggcttttcagcattga
3 421    ctctttatccaaaagctccatttaagtgttaagttttgtgcaatcaagcaggaagatct
3 481    actgtgacatttgttctactgtggtattttgttctcttaccctctacataccacacaaa
3 541    atagattttacaacatgaccctggtttgectttattttcccactttttatgatatttta
3 601    gattttaaatctcggaatgttatatttgatcctgctttcatttgtgtgtatagcct
3 661    tcatcagatatttcaactgtatttcaaatattatgggaggtaggatcacctttgta
3 721    atcaaaactgtcaagtttgcattttatctactgatgtgtggtgtgtcggagtataactg
3 781    aacattggttatggccaaccattaaaaagggtcaactcattcagtaagctgggcccctgtg
3 841    cgtgcagatatgatttatgaataaactgaagcgttaagccgagtgatttctctgtttatt
3 901    gtccatggaggtttttatgtgatcagttttgtgtcaaagttatacatgctttgatcag
3 961    tcaactgctcatgctgtgatttttatgtcatgttaaatgctctctatggagccccctcag
4 021    tgacaactagctttggtattttttgctagcttttgcctgtctatctgtctatctaca
4 081    tgtatcttagtccagctctccacatgggttttaagtatcagctttgcaactcctcaagtggt
4 141    caacaagtcatttctaattttcatacatggtctcttttgattgtgcccagccgtcgtctgt
4 201    atataatatttgcttacattttctcatgtgctcatctctcataaattattctcttctgttag
4 261    ctttatctccctcttgttaatgttatagagaaagttgaagaagcagtagtactgactaac
4 321    tcttagagtttccacttgcatttttcttaaatatggatgcccaatgggtgaaacttggtt
4 381    tatgacgctgggaaagttaaataaaaaaaatgaactaaatataacctcaagggtgttgt
4 441    attgtctgaatgaactctggcactggtgaaaaacagcaactctcagaacagactaact
4 501    aataaatattttctcttttaaaaaaagttctcttttctttcaaacctcagactattttaa
4 561    gacaaaaaaaaa

```

图 1 瘤背石磺 *Os-IP<sub>3</sub>R* 基因 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

\*表示蛋白序列终止，灰色区氨基酸序列为G\*R\*GGG\*GD区，波浪线表示Poly(A)尾巴，下同

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Os-IP<sub>3</sub>R* from *O. struma*

\* means the end of protein sequence, the amino acid sequences in gray area is G\*R\*GGG\*GD area, Polyadenylation signal are shown in wavy, the same below

```

1      agaaaatctagcatactccacagcctggttgcccttttctATGTTGGTTGCATACTACTGT
1      M L V A Y Y C
61     TTGAAGGTACCTTTGGTTATCTTCAAGAGAGAGAAGGATCTGGCCCGCCAACCTGAGTTC
8      L K V P L V I F K R E K D L A R Q L E F
121    GATGGTTTGTATATTGTAGAGCAACCAAGTGATGATGACTTAAAGGCTTTGTGGGACAAG
28     D G L Y I V E Q P S D D D L K A L W D K
181    TTAGTTCTCAGTACACAGTCTTCCCTGAGAGCTACTGGGACAAGTTTGTGAAGAAGAAA
48     L V L S T Q S F P E S Y W D K F V K K K
241    GTTCGAACACGCTATGCAGAGCAGTATGACTATGATGCCATTAGTTCATTGCTAGGCATG
68     V R T R Y A E Q Y D Y D A I S S L L G M
301    GATCAAGGAGAACC GG TGGTCTCAGACACTGAGAAGTCCAAATTTTCCCATCATTCTTG
88     D Q G E P V V S D T E K S K F F P S F L
361    GCAAATGTGGACCTCAGTACCAGATTGGAAATGGGGTGCATTATAACTGACAACTCT
108    A N V D L Q Y Q I W K W G V I I T D N S
421    TTCTTGATCTGCTGTGGTATTTCCCTTTCTCCATCCTGGGCAACTTAACTACTTCTTC
128    F L Y L L W Y F L F S I L G N F N Y F F
481    TTTGCCGCCATTTGTTGGATGTGGCTATTGGCTTCAAGACACTGCGTACCATCTTGCAG
148    F A A H L L D V A I G F K T L R T I L Q
541    TCTGCTACTCACAATGGCAAGCAGCTTGT TTTGACAGTATGTTAACCTGTGTGGTGGT
168    S V T H N G K Q L V L T V M L T C V V V
601    TACATCTATACGGTTGTGGCCTTCAACTTCTTTAGGAAATTTTATGTTAAAGAAGAAGAT
188    Y I Y T V V A F N F F R K F Y V K E E D
661    GGATCTGTTGACTATAAATGTCATGATATGGCCACGTGCTTTGTGTACCATCTCCACACT
208    G S V D Y K C H D M A T C F V Y H L H T
721    GGTGT CAGGGCTGGTGGAGGCATTGGTGTGAAATTGAGCCAGCTGATGGTGTGCAAGT
228    G V R A G G I G D E I E P A D G D A S
781    GAGGTTTACAGAATCTTGT TTTGACATCACATTCTCTTTTTCGTCATTGTCATTCTATTG
248    E V Y R I L F D I T F F F F V I V I L L
841    GCTATTATCAAGGTTTGATTATTGATGCCTTTGGAGAGCTCAGGGACCAGCTGGAGCAG
268    A I I Q G L I I D A F G E L R D Q L E Q
901    GTCAAAGAAGATATGGAGTCCAAGTCTTCTGTTGCAATTGGAAAAGACTATTTCGAT
288    V K E D M E S K C F I C G I G K D Y F D
961    AAAGTGCTCATGGATTTGAAATCCATGTCAAGAATGAACACAATTTGCCAATTACATG
308    K V P H G F E I H V K N E H N F A N Y M
1 021  TTTTTATCATGCACCTGATCAACAAACCTGATACAGAATATACTGGACAAGAACTTAT
328    F F I M H L I N K P D T E Y T G Q E T Y
1 081  GTGTGGGAAATGTATCAGAATCGCTGCTGGGATTTCTTCCCTGTTGGTGAATGTTTCCGT
348    V W E M Y Q N R C W D F F P V G E C F R
1 141  AAACAGTATGAAGATGAAGACTCAAGATGAgttaatcaaacatgtcattgtttatata
368    K Q Y E D E D S R *
1 201  agctctgctacctgattgtcaaatagagtgattatgatattcaaaaaaaaaa

```

图 2 瘤背石磺 *Os-RyR* 基因 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Os-RYR* from *O. struma*

疣桑椹石磺的神经组织中和紫色疣石磺的腹足组织中几乎不表达; *Os-IP<sub>3</sub>R* 在紫色疣石磺的大部分组织中表达量极低; 相较于其他 2 种石磺, *Os-IP<sub>3</sub>R/Os-RyR* 表达量百分比在瘤背石磺中为最高, *Os-IP<sub>3</sub>R/Os-RyR* 的相对表达百分比与各种石磺生活环境的地理趋势相一致, 依次为瘤背石

磺 > 疣桑椹石磺 > 紫色疣石磺 (图 9), 陆栖性越强, *Os-IP<sub>3</sub>R/Os-RyR* 的相对表达百分比越高。

### 3 讨论

目前, *IP<sub>3</sub>R* 和 *RyR* 基因在人、小鼠、非洲爪蟾、黑腹果蝇和秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis el-*

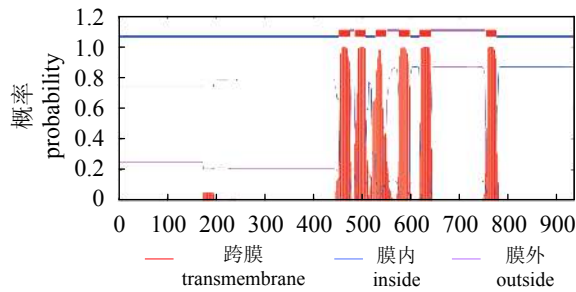


图 3 瘤背石磷IP<sub>3</sub>R蛋白跨膜区分析结果

Fig. 3 Prediction results of transmembrane region of IP<sub>3</sub>R in *O. struma*

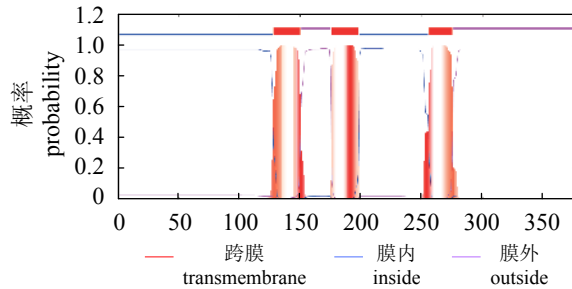


图 4 瘤背石磷RyR蛋白跨膜区分析结果

Fig. 4 Prediction results of transmembrane region of RyR in *O. struma*

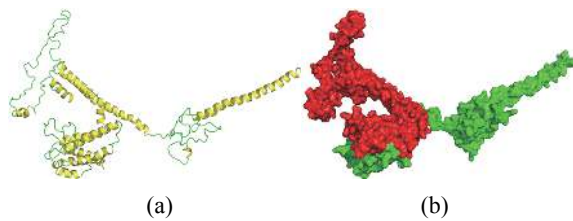


图 5 预测的瘤背石磷IP<sub>3</sub>R三级结构

(a)二级结构主要为 $\alpha$ 螺旋和无规则卷曲；(b)预测的IP<sub>3</sub>R的钙离子通道为红色区域，下同

Fig. 5 IP<sub>3</sub>R in *O. struma* tertiary structure predicted

(a) the secondary structure is compose of alpha helix and random coil; (b) the red region is calcium ion channel of IP<sub>3</sub>R predicted, the same below

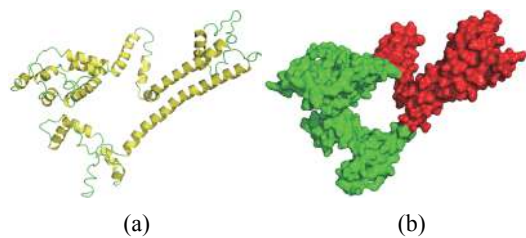


图 6 预测的瘤背石磷RyR三级结构

Fig. 6 RyR in *O. struma* tertiary structure predicted

表 3 IP<sub>3</sub>R登录号

Tab. 3 NCBI accession numbers of IP<sub>3</sub>R used in this study

蛋白 protein	登录号 accession no.
人 <i>Homo sapiens</i>	Q14643
牛 <i>Bos taurus</i>	Q9TU34
小鼠 <i>Mus musculus</i>	P11881
非洲爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	BAA03304
壁虎 <i>Gekko japonicus</i>	XP_015274299
朱鹮 <i>Nipponia nippon</i>	XP_009468187
游隼 <i>Falco peregrinus</i>	XP_013156848
红冠蕉鹃 <i>Tauraco erythrolophus</i>	XP_009982440
大山雀 <i>Parus major</i>	XP_015496289
斑点雀鳢 <i>Lepisosteus oculatus</i>	XP_015202834
硬骨舌鱼 <i>Scleropages formosus</i>	XP_018612138
加州双斑蛸 <i>Octopus bimaculoides</i>	KOF69582
加州海兔 <i>Aplysia californica</i>	Q27J07
光滑双脐螺 <i>Biomphalaria glabrata</i>	XP_013068043
瘤背石磷 <i>Onchidium struma</i>	KY794923
豆荚草盲椿 <i>Lygus hesperus</i>	JAQ03465
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	P29993

egans)等物种中已被克隆，但未见研究者利用2个进化等级不同的基因来探讨种间的进化。本研究通过转录组数据挖掘和RACE技术，扩增到瘤背石磷*Os-IP<sub>3</sub>R*和*Os-RyR*的cDNA序列。发现*Os-IP<sub>3</sub>R*和*Os-RyR*编码的氨基酸在G\*R\*GGG\*GD区高度保守，该保守区位于2个蛋白序列预测的钙离子通道区域。跨膜区预测发现石磷IP<sub>3</sub>R是一个6次跨膜蛋白，羧基端(C端)和氨基端(N端)都位于细胞膜内；RyR是一个3次跨膜蛋白，羧基端(C端)位于细胞膜内，氨基端(N端)位于细胞膜外。Seo等<sup>[19]</sup>对IP<sub>3</sub>R和RyR做了结构分析，RyR只能形成同源四聚体结构，而IP<sub>3</sub>R通道可以是同源四聚体也可以是非同源四聚体，它们都能调控Ca<sup>2+</sup>的释放，并且在调控Ca<sup>2+</sup>释放时呈“铃铛”的形状。

在哺乳动物中RyR存在3种亚型<sup>[15]</sup>，非哺乳的脊椎动物如牛蛙中存在2种RyR亚型<sup>[16]</sup>，一些低等的生物就只存在一种亚型的RyR<sup>[17]</sup>。在高等动物中，RyR1主要在骨骼肌中大量表达；RyR2主要在心肌、平滑肌和神经系统中表达；RyR3



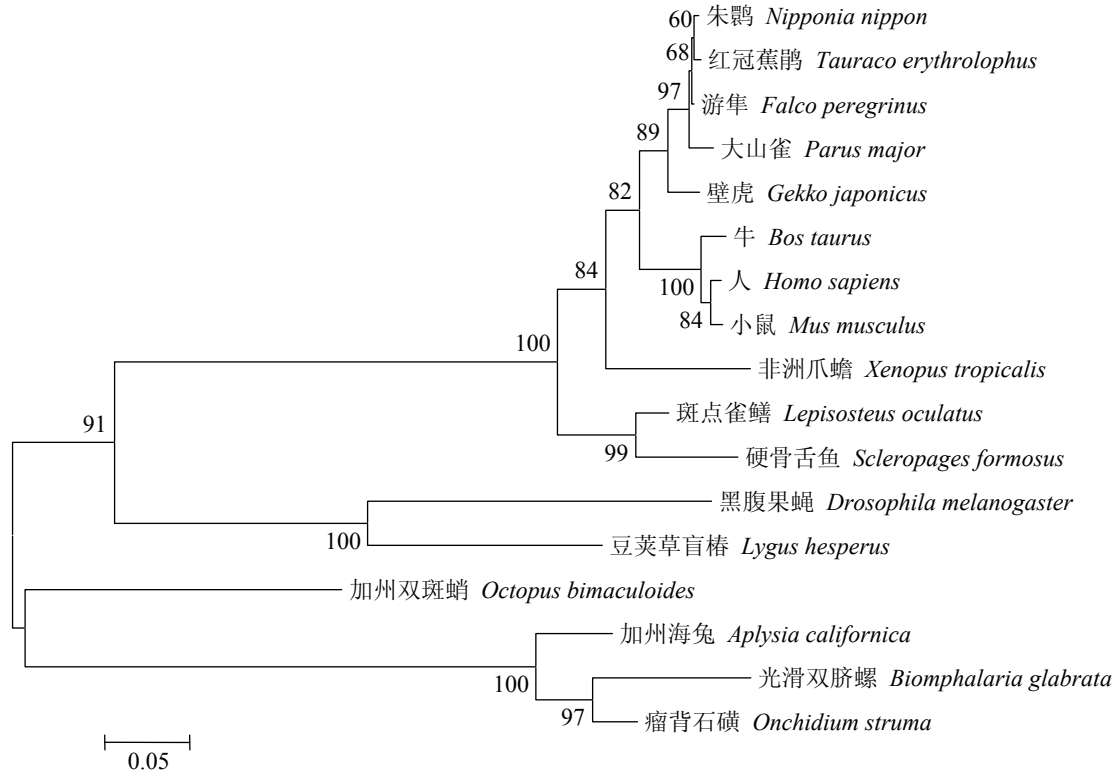


图 7 基于 *Os-IP<sub>3</sub>R* 编码的氨基酸序列的聚类分析

Fig. 7 Phylogenetic analysis based on amino acid sequences deduced by *Os-IP<sub>3</sub>R*

表 4 各物种 RyR 的 NCBI 登录号

Tab. 4 NCBI accession numbers of RyR used in this study

蛋白 protein	登录号 accession no.
人 <i>Homo sapiens</i>	P21817
牛 <i>Bos taurus</i>	NP_001193706
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NM_001102571
小鼠 <i>Mus musculus</i>	E9PZQ0
野猪 <i>Sus scrofa</i>	NP_001001534
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_021437456
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	XP_013127448
褐牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	XP_019941589
非洲爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	XP_012824471
加州双斑蛸 <i>Octopus bimaculoides</i>	KOF67049
瘤背石磺 <i>Onchidium struma</i>	KY794924
光滑双脐螺 <i>Biomphalaria glabrata</i>	XP_013065477
长牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	XP_011434551
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	NP_001246211

在大部分细胞中都表达, 但表达量很低。RyR 在石磺中虽然只存在一种亚型, 但在生物体中

实则充当3个亚型的角色。在哺乳动物中有3种亚型的 *IP<sub>3</sub>R*, 但在石磺中也只能找到一种亚型。在哺乳动物中曾研究过3种 *IP<sub>3</sub>R* 亚型的功能, 如 *IP<sub>3</sub>R2* 和 *IP<sub>3</sub>R3* 的缺失会造成小鼠生理异常<sup>[20-21]</sup>。

许多研究将 RyR 或者 *IP<sub>3</sub>R* 的缺失和人类疾病联系在一起, RyR 的缺失会造成很多人类疾病<sup>[22]</sup>, 然而只有一种 *IP<sub>3</sub>R* 的缺失会造成人类疾病<sup>[23]</sup>。这在某种程度上说明 RyR 对于生物体更为重要, 推测 RyR 可以替代 *IP<sub>3</sub>R* 行使部分功能, 这也许能解释紫色疣石磺中 *IP<sub>3</sub>R* 表达量极低, 但紫色疣石磺仍能正常生活。

系统发育进化树不仅说明了2个基因具有共同的起源, 也推断出 *IP<sub>3</sub>R* 结合 *IP<sub>3</sub>* 的功能不是固有存在, 而是由 RyR 进化来的<sup>[24]</sup>。本研究认为这种进化趋势在低等生物中更容易体现, 石磺科贝类隶属于软体动物门, 进化等级较低, 靠海着陆而栖, 是一类比较古老的物种, 而 *IP<sub>3</sub>R* 和 RyR 之间存在的进化关系为研究石磺从海洋到陆地进化生物学提供一个新的切入点。石磺科贝类种类繁多, 生活环境多样, 3种石磺的生存环境呈现出梯度适应趋势, 瘤背石磺主陆栖, 平疣桑椹石磺水陆两栖, 紫色疣石磺主水栖。 *Os-*

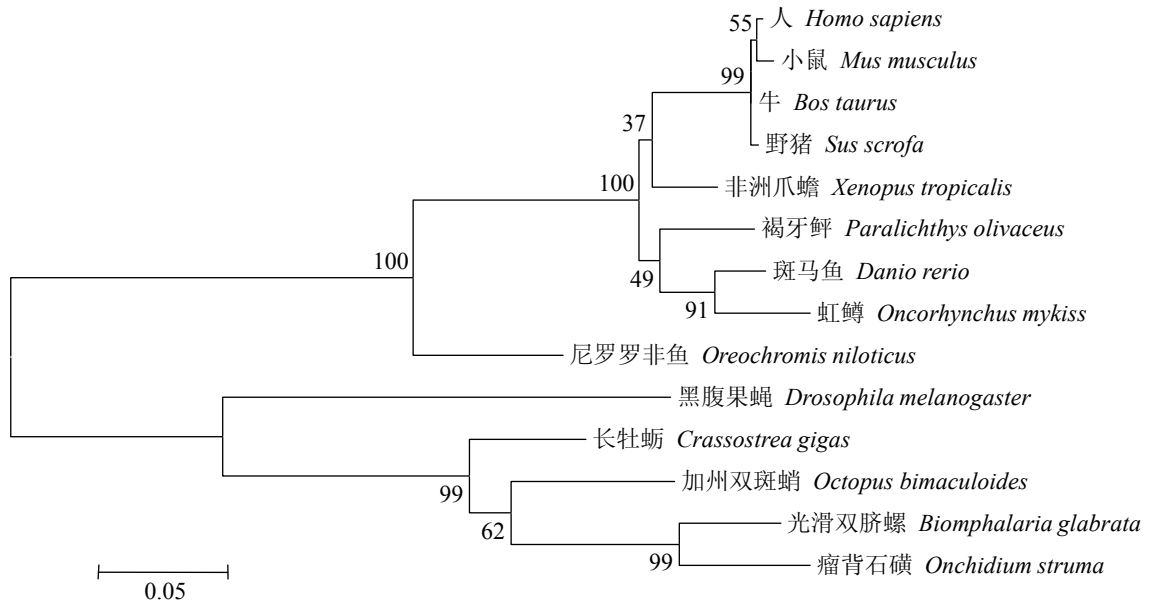


图 8 基于 *Os-RyR* 编码的氨基酸序列的聚类分析

Fig. 8 Phylogenetic analysis based on amino acid sequences deduced by *Os-RyR*

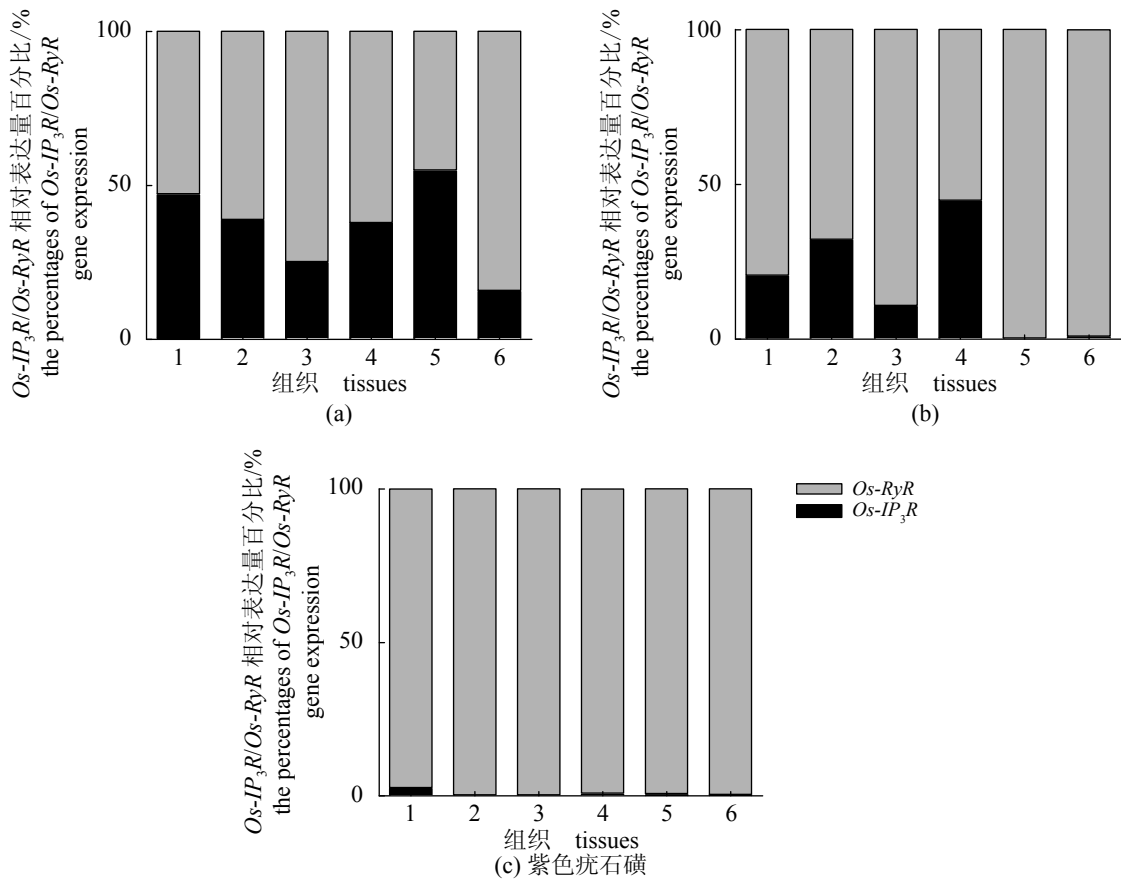


图 9 *Os-IP<sub>3</sub>R* 和 *Os-RyR* 在 3 种石磺的不同组织中的相对表达百分比

1. 背部皮肤, 2. 腹部皮肤, 3. 腹足, 4. 肺囊, 5. 神经, 6. 心脏. (a) 榴背石磺; (b) 平疣桑椹石磺; (c) 紫色疣石磺

Fig. 9 The percentage of relative expression of *Os-IP<sub>3</sub>R* and *Os-RyR* in different tissues of three species from Onchidiidae family

1. dorsal skin, 2. abdominal skin, 3. foot, 4. lung sac, 5. ganglion, 6. ventricle. (a) *O. struma*; (b) *P. mortoni*; (c) *P. verruculata*

*RyR* 和 *Os-IP<sub>3</sub>R* 在 3 个物种间的表达规律, 可对石磺的进化机制进行初步探索。

*Os-IP<sub>3</sub>R/Os-RyR* 的相对表达百分比随着石磺科贝类由浅海向湿地迁移的过程而逐渐升高, 说明了石磺在进化过程中对 *IP<sub>3</sub>R* 的钙离子调控功能需求量逐渐增加, 而 *IP<sub>3</sub>R* 在进化程度上高于 *RyR*, 因此 *IP<sub>3</sub>R/RyR* 表达量百分比的大小也反映了物种进化程度; *Os-IP<sub>3</sub>R/Os-RyR* 的相对表达百分比表现出瘤背石磺 > 平疣桑椹石磺 > 紫色疣石磺, 陆栖性越强则其 *Os-IP<sub>3</sub>R/Os-RyR* 的相对表达百分比越高, 进化等级高的 *IP<sub>3</sub>R* 所占的比例也较高, 这与石磺是从海洋向陆地进化的学说相符合。

许国绿和李杰为同等贡献第一作者。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Bouchet P, Rocroi J P. Classification and nomenclator of gastropod families[J]. *Malacologia*, 2005, 47(1-2): 247-369.
- [ 2 ] 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).
- [ 3 ] 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).
- [ 4 ] Clapham D E. Calcium signaling[J]. *Cell*, 2007, 131(6): 1047-1058.
- [ 5 ] Kudla J, Batistic O, Hashimoto K. Calcium signals: the lead currency of plant information processing[J]. *Plant Cell*, 2010, 22(3): 541-563.
- [ 6 ] Premkumar K V, Chaube S K. RyR channel-mediated increase of cytosolic free calcium level signals cyclin B1 degradation during abortive spontaneous egg activation in rat[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2014, 50(7): 640-647.
- [ 7 ] Missiaen L, De Smedt H, Droogmans G, *et al.*  $Ca^{2+}$  release induced by inositol 1,4,5-trisphosphate is a steady-state phenomenon controlled by luminal  $Ca^{2+}$  in permeabilized cells[J]. *Nature*, 1992, 357(6379): 599-602.
- [ 8 ] Seo M D, Enomoto M, Ishiyama N, *et al.* Structural insights into endoplasmic reticulum stored calcium regulation by inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2015, 1853(9): 1980-1991.
- [ 9 ] Cai X J, Clapham D E. Ancestral  $Ca^{2+}$  signaling machinery in early animal and fungal evolution[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2012, 29(1): 91-100.
- [ 10 ] Amador F J, Stathopoulos P B, Enomoto M, *et al.* Ryanodine receptor calcium release channels: lessons from structure-function studies[J]. *The FEBS Journal*, 2013, 280(21): 5456-5470.
- [ 11 ] Lanner J T, Georgiou D K, Joshi A D, *et al.* Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010, 2(11): a003996.
- [ 12 ] Bezprozvanny I. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors[J]. *Cell Calcium*, 2005, 38(3-4): 261-272.
- [ 13 ] Cai X J. Unicellular  $Ca^{2+}$  signaling 'toolkit' at the origin of metazoa[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, 25(7): 1357-1361.
- [ 14 ] Prole D L, Taylor C W. Identification of intracellular and plasma membrane calcium channel homologues in pathogenic parasites[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(10): e26218.
- [ 15 ] Giannini G, Conti A, Mammarella S, *et al.* The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1995, 128(5): 893-904.
- [ 16 ] Oyamada H, Murayama T, Takagi T, *et al.* Primary structure and distribution of ryanodine-binding protein isoforms of the bullfrog skeletal muscle[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(25): 17206-17214.
- [ 17 ] Maryon E B, Coronado R, Anderson P. *Unc-68* encodes a ryanodine receptor involved in regulating *C. elegans* body-wall muscle contraction[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1996, 134(4): 885-893.
- [ 18 ] Iwai M, Tateishi Y, Hattori M, *et al.* Molecular cloning of mouse type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and identification of a novel type 2 receptor splice variant[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(11): 10305-10317.
- [ 19 ] Seo M D, Velamakanni S, Ishiyama N, *et al.* Structural and functional conservation of key domains in *InsP<sub>3</sub>* and ryanodine receptors[J]. *Nature*, 2012, 483(7387): 108-

- 112.
- [20] Futatsugi A, Nakamura T, Yamada M K, *et al.* IP<sub>3</sub> receptor types 2 and 3 mediate exocrine secretion underlying energy metabolism[J]. *Science*, 2005, 309(5744): 2232-2234.
- [21] Fukuda N, Shirasu M, Sato K, *et al.* Decreased olfactory mucus secretion and nasal abnormality in mice lacking type 2 and type 3 IP<sub>3</sub> receptors[J]. *European Journal of Neuroscience*, 2008, 27(10): 2665-2675.
- [22] Lanner J T. Ryanodine receptor physiology and its role in disease[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2012, 740: 217-234.
- [23] Yamazaki H, Nozaki H, Onodera O, *et al.* Functional characterization of the P1059L mutation in the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 identified in a Japanese SCA15 family[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 410(4): 754-758.
- [24] Stathopoulos P B, Seo M D, Enomoto M, *et al.* Themes and variations in ER/SR calcium release channels: structure and function[J]. *Physiology*, 2012, 27(6): 331-342.

## Clone and relative expression of *Os-IP<sub>3</sub>R* and *Os-RyR* to discuss the evolutionary relationship in Onchidiidae

LI Jie , XU Guolü , SHEN Heding \* , GU Bingning , YANG Tiezhu

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In this study, full-length cDNA of *Os-IP<sub>3</sub>R* and *Os-RyR* in *Onchidium struma* was cloned by transcriptome data mining and rapid amplification cDNA ends (RACE) methods, and we analyzed the relationship between the percentages of *Os-IP<sub>3</sub>R/Os-RyR* expression and the evolution of 3 species from family Onchidiidae. The bioinformatic analysis and expression pattern of *Os-IP<sub>3</sub>R* and *Os-RyR* in different tissues from *Onchidium struma*, *Platevindex mortoni* and *Peronia verruculata* detected by Real-time quantitative PCR were performed. The results show that length cDNA of *Os-IP<sub>3</sub>R* consists of 4 574 base pairs (bp), and 2 808 bp open reading frame (ORF) which encodes 935 amino acids. The predicted molecular of the deduced amino acid of *IP<sub>3</sub>R* has six transmembrane domains. The length cDNA of *Os-RyR* consists of 1 253 base pairs (bp), and 1 131 bp open reading frame (ORF) which encodes 376 amino acids. The predicted molecular of the deduced amino acid of *RyR* has three transmembrane domains. The *IP<sub>3</sub>R* and *RyR* amino acid sequences in *O. struma* were aligned and found to be highly conserved in the G\*R\*GGG\*GD at region of calcium channel. *Os-IP<sub>3</sub>R* and *Os-RyR* were detected by qRT-PCR in different tissues of three kinds of Onchidiidae, and the percentages of *Os-IP<sub>3</sub>R/Os-RyR* expression from three species were consistent with their living environment (from high tide zone to shallow sea), followed by *O. struma*, *P. mortoni* and *P. verruculata*. The species of higher terrestrial ability with higher percentages of *Os-IP<sub>3</sub>R/Os-RyR* gene expression, illustrated percentage of gene expression associated with evolutionary degree. According to the comparison of percentage in Onchidiidae, we hope to provide a valuable clue for amphibian investigators, and to give a molecular biology clue for studying sea to land transition of marine invertebrate.

**Key words:** Onchidiidae; *Os-RyR*; *Os-IP<sub>3</sub>R*; qRT-PCR; percentage of gene 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