



## 瘤背石磺 *NR1* 基因的克隆和序列分析以及 低频声音刺激对其表达的影响

钱 畅<sup>1,2,3</sup>, 肖海明<sup>1,2,3</sup>, 陈锡林<sup>1,2,3</sup>, 张小明<sup>1,2,3</sup>, 土志涵<sup>1,2,3</sup>, 沈和定<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 长期栖息于潮间带的瘤背石磺能感知潮汐来临时产生的低频声音, 本研究模拟潮汐的低频声音刺激瘤背石磺, 探讨 *NR1* 型受体基因在瘤背石磺感应低频声音的行为中发挥的作用。首先通过 cDNA 末端扩增法 (RACE) 得到瘤背石磺 *NR1* 基因 (*OrNR1*) cDNA 全长, 进行生物信息学分析, 并通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 *OrNR1* 基因在各组织以及不同低频声波刺激下神经节中的表达。结果显示, *OrNR1* 基因全长 2 434 bp, 其中 5'非编码区 (UTR) 长 357 bp, 3'UTR 长 184 bp, 1 893 bp 开放阅读框共编码 630 氨基酸。瘤背石磺 *OrNR1* 蛋白分子质量约为 70.29 ku, 等电点为 5.93, 分子式为  $C_{3153}H_{4911}N_{833}O_{924}S_{32}$ 。 *OrNR1* 基因含有信号肽, 一个预测的甘氨酸和谷氨酸结合位点, 一个跨膜域, 多序列比对结果表明各物种间 *NR1* 具有较高的保守性。系统进化树结果显示, 瘤背石磺 *OrNR1* 基因与加州海兔亲缘关系最高, 符合传统形态学分类。qRT-PCR 结果显示, *OrNR1* 在瘤背石磺不同组织均有表达, 在神经节中相对表达量最高, 其次是肝胰腺、腹足, 而在口器和背部皮肤中表达量较低 *OrNR1* 在频率为 200、160 Hz 的低频声音刺激下表达量在不同时间组均显著高于对照组, 40 Hz 的低频声音刺激下 2 h 后表达量显著高于对照组; 在 120 Hz 时 *OrNR1* 基因表达量受到抑制, 不同组的表达量有显著差异。推测该基因在瘤背石磺低频声音感知中起到了重要作用。

**关键词:** 瘤背石磺; *OrNR1*; 低频声波; 潮汐节律; 基因克隆

中图分类号: Q 786; S 968.3

文献标志码: A

瘤背石磺 (*Onchidium reevesii*) 隶属于软体动物门 (Mollusca) 腹足纲 (Gastropoda) 肺螺亚纲 (Pulmonata) 柄眼目 (Stylommatophora) 石磺科 (Onchidiidae)<sup>[1]</sup>。瘤背石磺生活在潮间带, 其生活和潮汐息息相关, 具有明显的潮汐节律。潮水涨落会带来丰富的食物, 野生瘤背石磺需要提前感应潮水躲避, 并在退潮后出来觅食<sup>[2]</sup>。瘤背石磺广泛分

布在我国东南沿海地区, 其神经组织简单容易获取, 可发展为研究无脊椎动物神经科学的模式生物。

由于海洋环境的特殊性, 海洋环境噪声十分复杂, 其中海水波浪会产生低于 200 Hz 的低频声音, 对海洋生物产生复杂的影响<sup>[3]</sup>。近年来, 关于海洋环境噪声研究越来越多, 但大部分都集中在鱼类, 关于无脊椎动物研究较少, 尽管有很多

收稿日期: 2022-03-01 修回日期: 2022-09-15

资助项目: 上海市协同创新中心任务团队经费 (A1-3605-21-000202)

第一作者: 钱畅 (照片), 从事海洋贝类功能基因研究, E-mail: 1044558247@qq.com

通信作者: 沈和定, 从事海洋贝类系统进化研究, E-mail: hdshen@shou.edu.cn



研究已经证明无脊椎动物可以接收到声音信号<sup>[4-6]</sup>。有研究发现, 风力发电打桩机产生的噪音对长鳍近海鲑鱼 (*Doryteuthis pealeii*) 捕食猎物的影响, 与对照组相比长鳍近海鲑鱼在噪音干扰下捕食效率更低, 而且在噪音的影响下, 无论其捕食与否都会对噪音产生警觉, 从而终止捕食行为<sup>[7]</sup>。Wale 等<sup>[8]</sup>在实验室模拟船舶噪音改变了螃蟹的觅食行为, 会降低它们的生长速率。海洋双壳类可能通过平衡囊感应声音, 这是一种对水上机械振动高度敏感的机械感受器。Vazzana 等<sup>[9]</sup>研究了实验室发出的声音信号对紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 的影响, 其中低频率声音 (0.1~5.0 kHz) 处理的成体紫贻贝在血浆和各组织中的生化应激参数如葡萄糖、总蛋白、总血细胞数 (THC)、热休克蛋白 70 (Hsp70) 和乙酰胆碱酯酶 (AChE) 等活性均显著升高。

N-甲基-D-天冬氨酸受体 (NMDARs) 属于电压和配体双门控的离子通道, 作为谷氨酸受体家族成员, 其可允许带正电的离子如钙离子、钾离子等通过突触膜<sup>[10]</sup>。NMDARs 与学习和记忆相关的突触可塑性, 长时程增强, 神经病理性疼痛, 听觉神经中枢等密切相关<sup>[11-14]</sup>。NMDA 受体是由不同亚基单位组成, NR1、NR2 (NR2A-NR2D) 和 NR3 (NR3A-NR3B), 其中 NR1 是 NMDAR 的主要亚基, 是其功能受体形成所必需的。Tang 等<sup>[15]</sup>研究了不同年龄段小鼠 (*Mus musculus*) 螺旋神经节神经元 NR1 表达情况, 其表达随着年龄增长而增加, 这可能与耳蜗突触传递功能随增龄而改变有关。水杨酸可引起听力损失和耳蜗损伤, 在水杨酸处理后小鼠螺旋神经节神经元 (spiral ganglion neurons, SGNs) 中的 NR1 亚基过表达, 从而过度激活 NMDA 受体, 大量的  $Ca^{2+}$  流入 SGNs, 触发下游酶破坏 SGNs 的结构, 包括细胞骨架、膜和 DNA 的成分, 由于小鼠 SGNs 的再生能力非常低, SGNs 的损伤会导致永久性的听力下降<sup>[16]</sup>。

近年来越来越多的研究学者关注软体动物中 NMDA 受体的研究。在软体动物加州海兔 (*Aplysia californica*) 中, 通过感觉神经元与运动神经元的共培养, 研究了 NMDA 受体在突触传递中的作用, 并进一步探讨突触连接与存储记忆相关联系。在关于静水椎实螺 (*Lymnaea stagnalis*) 的研究中, NMDA 受体已被证明在其记忆消退 (memory extinction) 中发挥作用<sup>[17]</sup>。Vogeler 等<sup>[18]</sup>在对长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的研究中指出 NMDA 受体在长

牡蛎幼虫的发育变态中发挥重要作用, 在对幼虫中 NMDA 受体的原位杂交实验结果显示, NMDA 受体多分布于中枢神经区和腹足网络区。

为了研究 NMDA 受体是否参与软体动物瘤背石磺神经活动和低频声音感应, 本研究通过 RACE 技术成功克隆出瘤背石磺 *OrNR1* 基因的 cDNA 全长, 并进行生物信息学分析; 实时荧光定量 (qRT-PCR) 检测瘤背石磺不同组织以及不同频率的声波刺激瘤背石磺神经节组织中 *OrNR1* 基因的表达量, 为今后进一步研究软体动物 NMDA 受体功能、识别声音提供相关数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

2021 年 5 月初在江苏省盐城沿海采集瘤背石磺, 取滩涂海泥平铺在瘤背石磺养殖箱内, 将其暂养于实验室。每日早晚喷洒海水和投喂适量玉米粉并及时清理杂物, 保持适宜瘤背石磺生长的环境。实验过程中操作人员严格遵守《中国实验动物管理条例》伦理规范, 并按照上海海洋大学动物伦理委员会制定的规章制度执行。

### 1.2 瘤背石磺 RNA 提取和 cDNA 反转录

所用实验器材高压灭菌后, 于干净解剖盘中使用医用剪刀从石磺泄殖孔剪入, 剪开背部皮肤使各部分组织清晰可见, 随后剪取瘤背石磺实验所需组织, 研磨机处理后按照 TRIzol 法提取各组织的总 RNA。使用仪器 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, 美国) 检测其浓度以及纯度, 1% 的琼脂糖凝胶电泳验证完整性。cDNA 模板的合成使用 HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒获得, cDNA 可用于后续实验,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.3 *OrNR1* 基因克隆及序列分析

从本实验室瘤背石磺神经节转录组数据中, 筛选出 *OrNR1* 基因的转录组序列。利用 Primer Premier 5.0 软件在 ORF 范围内设计特异性验证及 RACE 引物 (表 1), 巢式 PCR 扩增法扩增后通过回收试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司] 回收后送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。将所得到的全部测序结果用 BioEdit 软件拼接序列得出 *OrNR1* 基因的全长序列, 通过 ORFfinder 在线预测 *OrNR1* 基因的开放阅读框, 氨基酸序列通

过 ProtParam 在线预测理化性质, ProtScale 在线预测疏水性。采用 TMHMM-2.0 在线预测其跨膜域, SignalP-5.0 预测信号肽。糖基化位点与磷酸化位点分别由 NetNGlyc1.0Server 与 NetPhos3.1Server 在线预测。通过 SMART 在线预测蛋白结构域,

Phyre2 在线预测蛋白二级结构, SWISS-MODEL 在线预测蛋白三级结构。使用 DNAMAN 软件进行氨基酸多序列比对, MEGA5 软件构建系统进化树, 采用 Neighbor-Joining Method, 1 000 次 Bootstraps, 除此以外并未改变其他参数。

表 1 实验所用的引物序列

Tab. 1 The sequences of primers used in this study

引物名称 primers	引物序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
NR1-F-1	TTGCAGTCCAGCAGGTCATT	片段验证 segment verification
NR1-R-1	TTTGCACCATTACCAAGCG	片段验证 segment verification
NR1-F-2	GAGGACTGGGCATGGATTGT	片段验证 segment verification
NR1-R-2	TCAGGGGTGCCACAATTAGG	片段验证 segment verification
NR1-F-3	AAGATCTCCCGCAACCTCAC	片段验证 segment verification
NR1-R-3	CCATGCCCAACACTCTAGCA	片段验证 segment verification
NR1-3'RACE-Inner	ACCTTTGGATCGTTTCTCCCCCT	3'RACE
NR1-3'RACE-Outer	GAAGCAGACCTAATTGTGGCACCC	3'RACE
NR1-5'RACE-Inner	GCCCCTCGGTCTTAGCCTACTTAC	5'RACE
NR1-5'RACE-Outer	TTGATGCGAGTAGGGTGGGACAGT	5'RACE
NR1-RT-F	TGACGACACAGAGGAGGATG	NR1 荧光定量引物 qRT-PCR of NR1
NR1-RT-R	CATGCCCAACACTCTAGCAC	NR1 荧光定量引物 qRT-PCR of NR1
18S-RT-F	TGTCTCTGCCCTACCTGTT	内参基因荧光定量引物 qRT-PCR of control
18S-RT-R	ATTCCATGCGCAATTATTCA	内参基因荧光定量引物 qRT-PCR of control

#### 1.4 *OrNR1* 基因的组织表达

从实验室养殖箱中挑取 9 只健康的、体重、体长相近的瘤背石磺, 将其分为 3 个样本组每组包含 3 只瘤背石磺, 取神经节、肝胰腺、蛋白腺、口器、腹足、背部皮肤, 每组内相同瘤背石磺组织组成一个混样, 按照“瘤背石磺 RNA 提取和 cDNA 反转录”中的方法使用 TRIzol 试剂提取 RNA 后反转录为 cDNA,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。根据 *OrNR1* 基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 qRT-PCR 引物 NR1-RT-F, NR1-RT-R(表 1)。以管家基因 18S *rRNA* 为内参基因<sup>[19]</sup>。使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行荧光定量反应, 相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算。

#### 1.5 低频声音刺激对瘤背石磺神经节 *OrNR1* 基因表达的影响

选取健康且体重、体长相近的瘤背石磺, 1 组为未经低频声音处理的对照组, 其余 5 组为低频声音实验组, 在实验室内使用 SA-SG020 型扫描信号发生器(无锡世教科技有限公司), SA-PA 功率放大器(无锡世教科技有限公司)发出正弦波的声波, 调节声波频率分别为 0、40、80、120、

160 和 200 Hz, 分别在 1、2、4、8、24 h 取样, 其中 0 Hz 为没有低频声音处理的对照组。每个样本组 9 个样品, 分为 3 个平行组并取 3 只瘤背石磺的神经节组成一个混样。神经节组织样品使用“瘤背石磺 RNA 提取和 cDNA 反转录”中的方法提取 RNA 并进行反转录, qRT-PCR 检测不同低频声音处理组中 *OrNR1* 基因在不同时间点的表达量, qRT-PCR 引物、反应体系与反应程序同“*OrNR1* 基因的组织表达”, 相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算。

#### 1.6 数据处理

所有数据采用平均值 $\pm$ 标准差表示。所得实验数据使用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 显著性水平设为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 *OrNR1* 基因的序列分析

*OrNR1* 基因全长 2 434 bp, 其中 5'非编码区 UTR 长 357 bp, 3'UTR 长 184 bp, 1 893 bp 开放阅读框共编码 630 氨基酸, 包含一个多聚腺苷酸加尾信号序列(AATAA), 25 bp 的 poly A 尾巴(图 1)。



```

1  GACCAGATCGAGGCGCAGTTATGCTAAACGTTATTATGGCAGCGAGCTTGAGACAGAAGCTAAATCCAAGCTAGACATCTAAACTAAGC
91  AGTAGCCACGCGATTTCATATATGCTTCTTACCAATACACGATCTGTTTTCTCGCATAATTAATAATATGATGTGCGATGCTAGTGAG
181  GCTGCTCCAACGTTTCATATCAGTCAGTTTACGTTTATTAGCCCTAATACCTTTGCTAGTAAGTAGGCTAAGGACCGAGGGGCTTAGATCTT
271  CTTAGGTTTCAACATTTGGGGCTTGAACAATCAATTAATACATGTGTCGAGTACGGAGGCTGTGATAACACACCTCTTTGGACCCAATG
1  M
361  GCAAAGTGTCTTCTAACAAGAATTGTGTGACAATTGTATCTATGCTATTCTGCAAAATGGTGTGTCAGTCCAGCAGGTCATTACA
2  A K C L L T R I V W T I V I L C Y S A K C G V A V Q Q V I T
451  ATTGGAGCTTCTCTAAGTTCAGAGAAAAAGAACAGGAATTTAAAGCAGCGTAGCAATCTTAATCACACAGATATGTCACCCATTTA
32  I G A S L S S E K M E Q E F K A A V A N L N H N S M V T H L
541  CGCTTCGAAGCCACAATTTCTCATGGACGACAACCAATTCGGTCTGCACTGGGATATTTGCAATAAATCTGCTGAGCAAGTATGTTT
62  R F E A T T I L M D S N P I L S A L D I C N K L L S K Y V F
631  ACAGCTGTGGCATCTCATCTAATTCACCTGACCACTCGCCTATATCAGTATCATAACATGTGGCTACTACCACATCTCTGTGTGGGA
92  T V V A S H P N S T D H S P I S V S Y T C G Y Y H I P V V G
721  ATATCAGCTCGTATCTGCATTTCTGATGTGAATGCCATAAGATGTTTTTGGCGACTGCCACCTACTCCCATCAAGCAGTGTGT
122  I S A R D S A F S D V N V H K M F L R T V P P Y S H Q A V V
811  TGGGTTGAGCTCTTGAACATTTGTCATGGCACAAGGTGATCTTTGTATACAGTCTGATGAGGAAGGGAGAGCTATGTGAGCAATTT
152  W V E L L K H L S W H K V I F V Y S A D E E G R A M L S K F
901  CAGACCTTTCAGAGGATGCAATCAAGATGAACCATCAATCAAGTATGCTCCAGGAGAGAAAACTATACAGCTAAATAGAGCCATT
182  Q T L A E D A I K I E P S I K Y A P G E K N Y T A K L E P I
1 801  CTAAGTGTACGTCAGAGTATTCTTCTGTGTCATCGACTGAGGATGCAGAAATCAATTTGCGTATCTGAGCAGCTGGGCATGACA
212  L K C T S R V I L L A A S T E D A E I I F R D S E Q L G M T
1 171  GGGGAGGACTGGGCATGGATGTGTGACAGCAAGCTTTTGATGCTTCAACATTCCTGCTGCTTTTAAAGCGTGGCTTGGTGAATGGT
242  G E D W A W I V S E Q A F D A F N I P V G F L S V R L V N G
1 261  GCAATGAAGTTAAACACATTAATGATGCGAGTAAAGTATTGGTCAGGCATTCACCAAGTAAATGAATACAGACACAAAAATGAATAC
272  A N E V N H I T D A V N V I G Q A F T K L M N T D T K I E Y
1 351  CCACCTGCAAACTGCACTAATCTGACAGGTGGTCTGATGGGAAAAGTTTATCAAGCTCTGATCAATACAGAGTTAAATGGAGAGACA
302  P P A N C T N L D R W S D G E K V Y Q A L I N T E L N G E T
1 441  GGCAAGTAAGCTTTGATGATGATGGAGACAGAGAAAAACCTATCTATGAAATTAATAAATGGAACAGAGCATCTATGCTGTG
332  G Q V S F D D D G D R E N P I Y E I M N I N G N R A S M S V
1 531  GGCTTGTGGTCACAAGAAAAGAACCTGGGTTTACGTATGAAGGTAATAATTTAACCTGGCCAGGCAACACTTTGTAAGCCGAAA
362  G L F G H K E K N L G L R M K G N N L T W P G N T F V K P K
1 621  GGTGAAAAGATCTCCCGCAACTCAGGATTTTACACTGAAAGAGAAACCATTTGTCAGGTGATCCAATGTCTAAAGATGGCCATTGT
392  G E K I S R N L T I V T L K E K P F V Q V I P M S K D G H C
1 711  ACTCCAGTAGCGCTGCAGTCCATGCTTTTCTTGCAGAAAAGAACTCATGATCTTGTCTGATGGGTATTGATGGATATGCTGGCA
422  T P V A P A V H A F P C R N G T H D L C C M G Y C M D M L A
1 801  AAAATGCTGATGAGGTGAGTTAATTTCACTGTCATCTAGCAAGGATGGATTATTGGTCTTTGAAAACACAATGGATCTGAC
452  K I A D E V Q F N F T L H L S K D G L F G S F E K H N G S D
1 891  AAAAGTACTGGAATGGCATGATGGGAGAATTGATGAATCAAGAAGCAGACCTAATGTGGCACCCCTGACTATCAATCCAGAGAGAGCC
482  K Y W N G M M G E L M N H E A D L I V A P L T I N P E R A
1 981  AATGATATTGATTTTACCAAGCCCTTAAAGTATCAAGTCTCAACATATTAGTCAGGAAGACTCAAAAGGACTCAAGCCTGGCCTCATT
512  N D I D F T K P F K Y Q G L N I L V R K T Q K D S S L A S F
2 071  CTGCAACCATTTCAAGATACTTTATGGATTTGGTTGGTCTGTCGGTCCAGCTGGTGGCCCTGGTGTACCTTTTGGATCGTTTCTCC
542  L Q P P Q D T L W I L V G L S V H V V A L V L Y L L D R F S
2 161  CCCTTTGGCAGTTCAGCTTGTCTAAGAGTGACACACAGAGGAGGATGCTTAACTGTCTAGTGAATGTGGTTTTCATGGGGGTT
572  P F G R F K L A K S D D T E E D A L N L S S A M W F S W G V
2 251  TTGTGAACAGTGGCATTGGTGAAGGCACCAAGAAGTTTCAGTCTAGAGTGTGGGATGGTCTGGGATTATGTAATGATATTAG
602  L L N S G I G E G T P R S F S A R V L G M V W D Y V N D I
2 341  CCTGATTAGCTTATCACAACCTTTAAATAGAAAATGCACTAGAAAATACAGCTAAGAAAGTATGACTTTAGAAATAAATTTCTATGTTG
2 431  ACTAGAGTCATAATTTATCTTTCATTCATCTAGTCTAGCAACAGATGATTGATTAAGATGACATACCCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
2 521  AAAA
    
```

图 1 *OrNR1* 基因 cDNA 序列和氨基酸序列

细线框标示起始密码子、终止密码子；粗下划线标示 L-谷氨酸和甘氨酸结合位点；波浪线标示跨膜域；单划线标示多聚腺苷酸加尾信号序列 (AATAA)。

Fig. 1 cDNA sequence and amino acid sequence of the *OrNR1* gene

Line frame indicates the start codon and the stop codon; bold underline indicates L-glutamate and glycine-binding site; wavy lines indicates transmembrane domain; thin underline indicates the polyadenylation tail signal (AATAA).

## 2.2 *OrNR1* 序列理化性质

预测编码 630 氨基酸其分子质量约为 70.29 ku, 等电点为 5.93, 分子式为  $C_{3153}H_{4911}N_{833}O_{924}S_{32}$ 。亮氨酸 (Leu)、缬氨酸 (Val)、丝氨酸 (Ser)、丙氨酸 (Ala) 含量较高, 占比分别为 9.2%、7.9%、7.5%、7.1%。预测其不稳定系数 33.43, 归类为稳定蛋白质。总平均亲水性系数 -0.075, 其在第 563 位氨基酸达到最高疏水性, 疏水指数为 3.144, 在第

酸 (Ala) 含量较高, 占比分别为 9.2%、7.9%、7.5%、7.1%。预测其不稳定系数 33.43, 归类为稳定蛋白质。总平均亲水性系数 -0.075, 其在第 563 位氨基酸达到最高疏水性, 疏水指数为 3.144, 在第

341 位氨基酸达到最高亲水性, 亲水指数为-3.056。信号肽结果预测于剪切位点 22~23 存在信号肽。

糖基化位点分析显示, OrNR1 含 9 个 N-糖基化位点; 磷酸化位点分析显示, 该基因编码的蛋白质有 65 个磷酸化位点, 分别为 Thr、Ser、Tyr 各 23、39 和 3 个。SMART 分析结果显示, 在 430~494 位存在一个甘氨酸和 L-谷氨酸结合位点。经 TMHMM 2.0 在线预测结果显示 548~567 位氨基酸存在有跨膜结构域。在二级结构中  $\alpha$  螺旋 10.09%,  $\beta$  折叠 13.38%, 在线预测三级结构如图 2 所示。

2.3 OrNR1 的多序列比对及其物种进化

使用 DNAMAN 将 OrNR1 氨基酸序列与其他无脊椎动物 NR1 氨基酸序列多重比对。系统进化树选取 14 个不同物种构建, 结果显示, 瘤背石磺首先与加州海兔合为一支, 随后与福寿螺 (Pomacea canaliculata)、红鲍 (Haliotis rufescens) 合为一大支, 再与欧洲平牡蛎 (Ostrea edulis)、长牡蛎、中华蛸 (Octopus sinensis)、美洲鲎 (Limulus

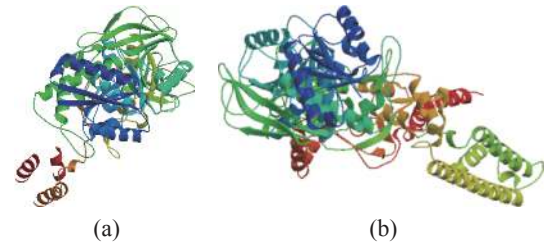


图 2 预测的 NR1 蛋白三级结构

(a) 预测的 OrNR1 蛋白三级结构; (b) 预测的加州海兔 NR1 蛋白三级结构。

Fig. 2 Predicted Tertiary structure of NR1 protein

(a) predicted tertiary structures of OrNR1 protein; (b) predicted Tertiary structure of A. californica NR1 protein.

polyphemus) 聚为无脊椎动物一支 (图 3); 另一分支为智人 (Homo sapiens)、小鼠、斑马鱼 (Danio rerio)、鲫 (Carassius auratus) 和热带爪蟾 (Xenopus tropicalis), 合为脊椎动物一支; 黑腹果蝇 (Drosophila melanogaster) 为一支。进化树结果显示, 瘤背石磺 OrNR1 蛋白的分子进化地位与其生物学分类一致 (图 4)。

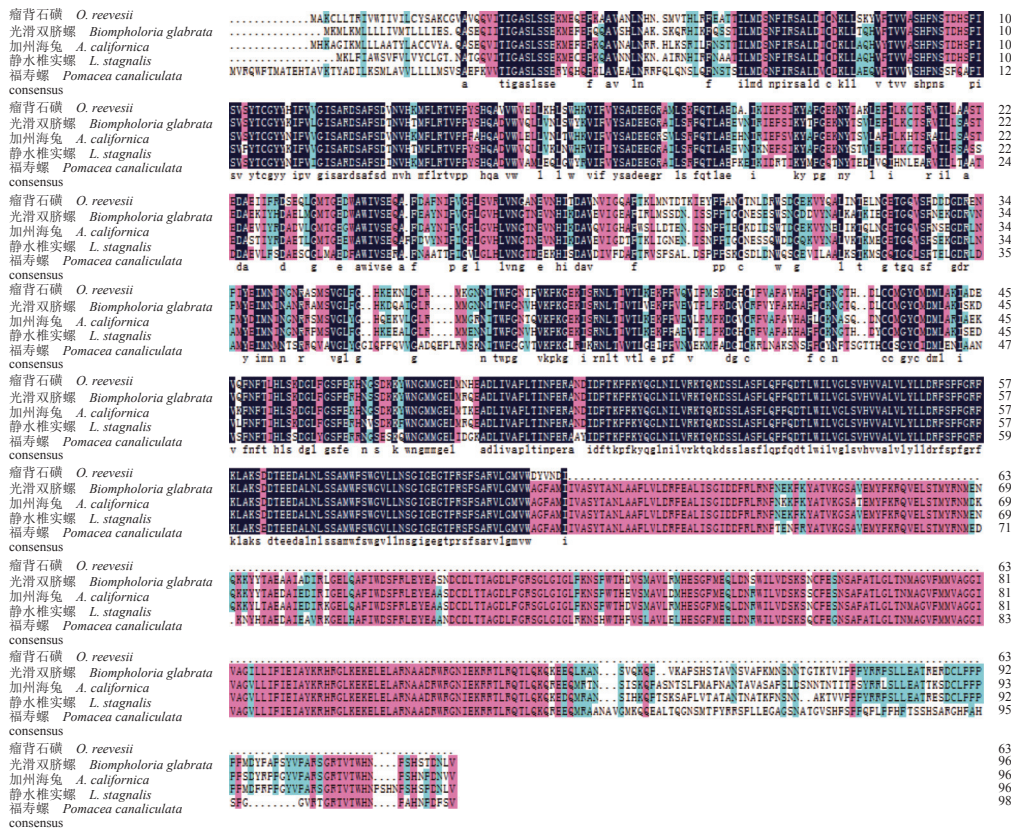


图 3 OrNR1 氨基酸序列与其他无脊椎动物 NR1 氨基酸序列的多重比对

黑色表示高度保守的氨基酸序列, 粉红色表示高度相似的氨基酸序列, 蓝色表示相似的氨基酸序列。

Fig. 3 Multiple alignments of the amino acid sequences of OrNR1 compared with other shellfish species

Black represents highly conserved amino acid, pink represents highly similar amino acid, and blue represents similar amino acid among species.

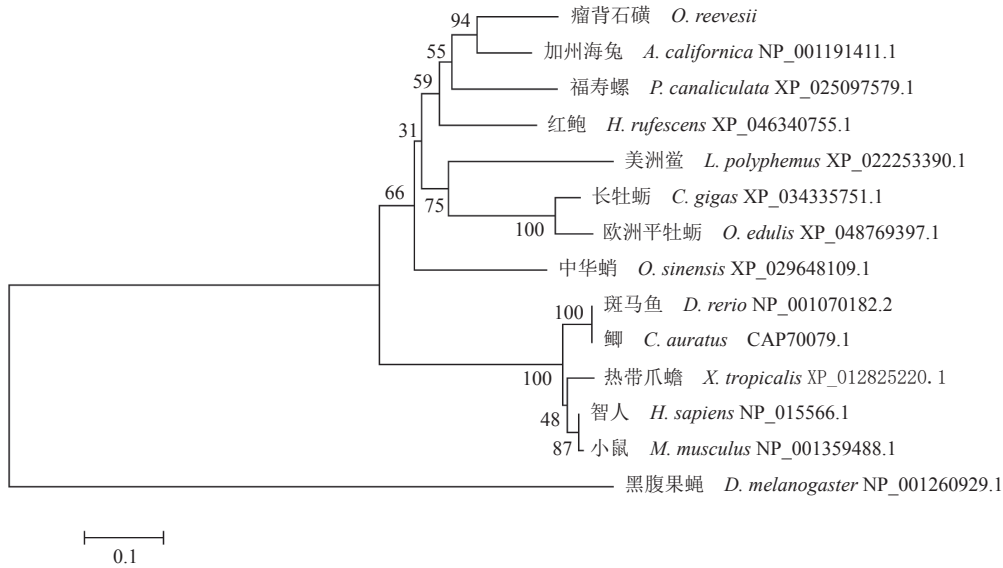


图 4 使用邻接法构建的 OrNR1 蛋白氨基酸序列系统进化树

Fig. 4 Construction of the OrNR1 protein amino acid sequence phylogenetic tree using the neighbor-joining method

2.4 OrNR1 基因在瘤背石磺不同组织的表达情况

OrNR1 在瘤背石磺神经节、肠、蛋白腺、腹足、肝胰腺、口器和背部皮肤各组织中实时荧光定量实验结果显示, OrNR1 在神经节中表达最高, 肝胰腺和腹足中也有较高的表达 ( $P < 0.05$ ), 在口器与背部皮肤组织中表达量较低且差异不显著 ( $P > 0.05$ )(图 5)。

2.5 低频声音刺激下瘤背石磺神经节 OrNR1 基因的表达情况

实验所用低频声音刺激模型是模拟潮间带海流产生的低频噪音 (0~200 Hz), 声音刺激频率为 0、40、80、120、160、200 Hz, 其中 0 Hz 为无声音刺激对照组, 分别刺激 1、2、4、8、24 h, 运用 qRT-PCR 检测每组的表达量。数据显著性差异分析是在同一时间点下对不同频率声音进行单因素方差分析。

荧光定量结果表明, 与对照组相 (0 Hz) 比较, 在瘤背石磺受到 160 和 200 Hz 低频声音刺激后, 各时间组内的 OrNR1 表达量均显著增高 ( $P < 0.05$ ); 而在 120 Hz 低频声音刺激下, OrNR1 表达量却受到明显抑制 ( $P < 0.05$ ); 80 Hz 低频声音刺激下, OrNR1 的表达量在 2~8 h 组的表达量低于对照组, 在 24 h 组表达量高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 40 Hz 低频声音刺激下, OrNR1 的表达量在 2 h 后均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )(图 6)。

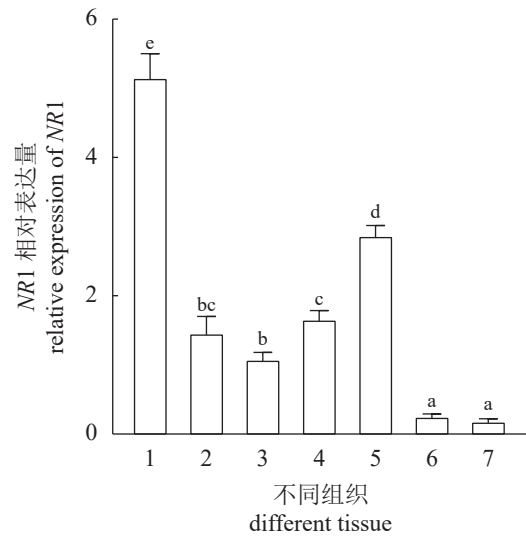


图 5 OrNR1 mRNA 在瘤背石磺不同组织的表达量

1. 神经节, 2. 肠, 3. 蛋白腺, 4. 腹足, 5. 肝胰腺, 6. 口器, 7. 背部皮肤; 不同字母表示实验组之间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 5 Expression of OrNR1 mRNA in different tissues of *O. reevesii*

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

3 讨论

NMDA 受体作为重要的兴奋性氨基酸受体, 广泛分布在中枢系统中, 受谷氨酸递质调控行使多种生理功能, 其在学习和记忆方面有着重要的作用如突触可塑性、长时程增强 (long term potentiation, LTP), 且其在听觉系统中也发挥着重要的



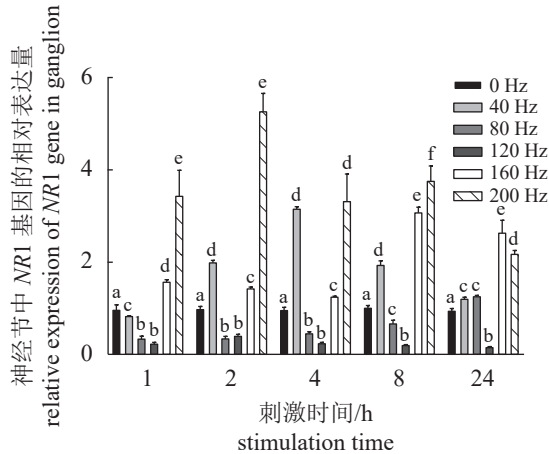


图6 *OrNR1* 基因在瘤背石磺神经节中不同声波频率刺激下的表达量

不同字母表示同一时间各实验组之间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 6 Expression of *OrNR1* at different acoustic frequency in *O. reevesii* ganglion

Values with different letters indicate significantly different at the same time ( $P < 0.05$ ).

作用, 与噪声性听觉损伤<sup>[20]</sup>、老年性耳聋<sup>[21]</sup>等相关听觉疾病密切相关。本实验利用 RACE 技术克隆了瘤背石磺 *OrNR1* 基因的 cDNA 全长, 预测 *OrNR1* 序列在 430~494 位存在一个甘氨酸和 L-谷氨酸结构域, 在 548~567 位氨基酸存在有跨膜结构域, 这也与其他物种相似<sup>[22-23]</sup>。从氨基酸多重序列比对结果可以看出 *OrNR1* 蛋白序列的结构域与其他软体动物高度相似, 暗示了其功能的保守。系统进化树显示瘤背石磺与加州海兔亲缘关系最近, 又与福寿螺、红鲍合为一支, 符合形态学的分类系统。

瘤背石磺 *OrNR1* 基因在本研究检测的 7 个组织中均有表达, 其中神经节中的表达量最高 ( $P < 0.05$ ), 这可能与 NMDA 受体在神经网络中广泛分布并参与相关神经系统活动有关, 瘤背石磺栖息于海洋潮间带, 对潮汐所带来的低频声音变化十分敏感, 而 NR1 亚基在学习与记忆、听觉中枢等相关通路发挥重要作用, 推测 *OrNR1* 基因可能参与了瘤背石磺感知潮汐低频声音以及潮汐记忆等相关神经生理活动。*OrNR1* 基因在腹足中有着较高的表达量 ( $P < 0.05$ ), 腹足是瘤背石磺重要的运动器官由肌肉组织组成, 同时瘤背石磺主要依靠腹足肌肉收缩运动寻觅食物。在脊椎动物中, NMDA 受体通过调节肌肉收缩的细胞内钙浓度或通过诱导一氧化氮和随后 cGMP 的级联反应来调节肌肉收缩<sup>[24]</sup>。在软体动物加州海兔与静水椎实

螺中, *NR1* 基因在其运动相关器官中大量表达, 这意味着 *NR1* 基因参与它们进食、运动、防御等相关行为<sup>[23]</sup>。而 *OrNR1* 基因在瘤背石磺腹足中大量表达可能意味着其能够调节瘤背石磺腹足神经肌肉网络中的肌肉收缩。此外, *OrNR1* 基因在肝胰腺、肠和蛋白腺中表达量较高 ( $P < 0.05$ ), 在马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 肝胰腺中 *NR1* 基因同样有着较高的表达量, 在受到脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激后, 马氏珠母贝出现炎症反应其肝胰腺中 *NR1* 基因表达量显著降低<sup>[25]</sup>。肝胰腺是瘤背石磺重要的免疫和抗氧化器官, 推测在瘤背石磺免疫、消化和代谢等方面 *OrNR1* 基因也起到一定的作用。

本研究通过声波信号器在实验室内模拟潮汐所引起的海洋低频声波刺激瘤背石磺, qRT-PCR 结果显示, *OrNR1* 基因在不同声音频率刺激下表达差异显著 ( $P < 0.05$ ), 不同频率的声音刺激同样会引起软体动物缢蛭 (*Simonovacula constricta*) 多个代谢类基因的表达变化, 此外声音的变化会影响缢蛭的挖掘行为<sup>[26]</sup>。当声音刺激频率为 160、200 Hz 时, 各时间组 *OrNR1* 基因表达量相较于对照组显著升高, 40 Hz 时 *OrNR1* 基因在 2 h 后表达量显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 在神经细胞生理活动中 NMDA 受体为钙离子通道, 通过 NMDA 受体钙离子内流并激活 *CaM-like* 基因以及下游因子 *CaMKII* 基因从而行使相关功能, 其他相关研究中瘤背石磺在受到低频声波刺激后 *CaM-like* 基因和 *CaMKII* 基因也在 6.2 和 12.4 h 维持着较高的表达量, 推测 *OrNR1* 基因作为钙离子通道受体基因在瘤背石磺感知低频声音行为中起到重要的作用<sup>[27]</sup>。当声音频率为 80、120 Hz 时 *OrNR1* 基因表达量却受到了一定程度的抑制, 在瘤背石磺感知低频声波相关研究中, 瘤背石磺神经节中的磷脂酶 C 在 100 Hz 的低频声音刺激下的表达量也很低, 而磷脂酶 C 可以调控钙调蛋白激活蛋白激酶, 在钙离子信号传导中发挥重要功能, 所以推测 *OrNR1* 基因表达量降低可能是因为瘤背石磺对该频率段的声音不敏感, 在声音的长期刺激下反而表达量受到抑制 ( $P < 0.05$ )<sup>[28]</sup>。*NR1* 基因参与软体动物加州海兔的长期记忆形成, 介导神经元兴奋性突触后电位的变化 (excitatory postsynaptic currents, EPSCs)<sup>[29]</sup>。瘤背石磺不能长期处于低氧环境中, 在潮水来临时要及时躲避至坑穴等安全处以免被潮水卷入较深海域, 推测是海水运动产生 160~200 Hz 的低频

声音和反复“躲避海水”的行为使瘤背石磺形成了对该频率段声音的记忆, 而 40 Hz 低频声音刺激下 *OrNR1* 基因的高表达可能因为低潮期是瘤背石磺摄食的高峰期, 因此在实验室也表现出对上述低频声音刺激的高表达, 长期的环境适应使得瘤背石磺形成了对声音的记忆<sup>[30]</sup>。在潮汐周期中, 涨退潮会产生低频声音影响潮间带生物, 包括其摄食和繁殖等多方面, 在本研究的低频声音刺激实验中, 瘤背石磺 *OrNR1* 基因对不同的低频声音的表达差异可能意味着瘤背石磺通过感知潮汐引起的声波变化来适应潮汐, 为研究潮间带生物的潮汐机制提供新的研究思路。

本研究成功克隆了 *OrNR1* 基因 cDNA 全长序列, 借助实验数据处理软件对 *OrNR1* 全长序列进行相关生物学分析, 组织差异表达表明其在瘤背石磺神经节中高表达, 不同频率声音刺激的实验结果表明瘤背石磺可以清晰地识别声波变化。本研究使用的低频声音频率基于自然因素, 海洋自发产生的低频声音对海洋生物一系列生态行为至关重要, 本研究的结果可为研究水下声音对海洋无脊椎动物行为和生态方面的作用提供基础数据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [1] 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]. *动物学杂志*, 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).
- [2] Arey L B, Crozier W J. The 'homing habits' of the pulmonate mollusk *Onchidium*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1918, 4(11): 319-321.
- [3] 张国胜, 顾晓晓, 邢彬彬, 等. 海洋环境噪声的分类及其对海洋动物的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(1): 89-94.  
Zhang G S, Gu X X, Xing B B, *et al.* The classification and the impact of marine environment noise on marine animals[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2012, 27(1): 89-94 (in Chinese).
- [4] Fewtrell J L, McCauley R D. Impact of air gun noise on the behaviour of marine fish and squid[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2012, 64(5): 984-993.
- [5] Sabet S S, Wesdorp K, Campbell J, *et al.* Behavioural responses to sound exposure in captivity by two fish species with different hearing ability[J]. *Animal Behaviour*, 2016, 116: 1-11.
- [6] Day R D, Fitzgibbon Q P, McCauley R D, *et al.* Lobsters with pre-existing damage to their mechanosensory statocyst organs do not incur further damage from exposure to seismic air gun signals[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 267: 115478.
- [7] Jones I T, Peyla J F, Clark H, *et al.* Changes in feeding behavior of longfin squid (*Doryteuthis pealeii*) during laboratory exposure to pile driving noise[J]. *Marine Environmental Research*, 2021, 165: 105250.
- [8] Wale M A, Simpson S D, Radford A N. Noise negatively affects foraging and antipredator behaviour in shore crabs[J]. *Animal Behaviour*, 2013, 86(1): 111-118.
- [9] Vazzana M, Celi M, Maricchiolo G, *et al.* Are mussels able to distinguish underwater sounds? Assessment of the reactions of *Mytilus galloprovincialis* after exposure to lab-generated acoustic signals[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2016, 201: 61-70.
- [10] Traynelis S F, Wollmuth L P, McBain C J, *et al.* Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function[J]. *Pharmacological Reviews*, 2010, 62(3): 405-496.
- [11] Giese K P. The role of CaMKII autophosphorylation for NMDA receptor-dependent synaptic potentiation[J]. *Neuropharmacology*, 2021, 193: 108616.
- [12] Lamsa K, Irvine E E, Giese K P, *et al.* NMDA receptor-dependent long-term potentiation in mouse hippocampal interneurons shows a unique dependence on Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinases[J]. *The Journal of Physiology*, 2007, 584(3): 885-894.
- [13] Inquimbert P, Moll M, Latremoliere A, *et al.* NMDA receptor activation underlies the loss of spinal dorsal horn neurons and the transition to persistent pain after peripheral nerve injury[J]. *Cell Reports*, 2018, 23(9): 2678-2689.
- [14] Chen G D, Kong J, Reinhard K, *et al.* NMDA receptor blockage protects against permanent noise-induced hearing loss but not its potentiation by carbon monoxide[J]. *Hearing Research*, 2001, 154(1-2): 108-115.



- [15] Tang X, Zhu X, Ding B, *et al.* Age-related hearing loss: GABA, nicotinic acetylcholine and NMDA receptor expression changes in spiral ganglion neurons of the mouse[J]. *Neuroscience*, 2014, 259: 184-193.
- [16] Ralli M, Troiani D, Podda M V, *et al.* The effect of the NMDA channel blocker memantine on salicylate-induced tinnitus in rats[J]. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, 2014, 34(3): 198-204.
- [17] Rosenegger D, Lukowiak K. The participation of NMDA receptors, PKC, and MAPK in *Lymnaea* memory extinction[J]. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2013, 100: 64-69.
- [18] Vogeler S, Carboni S, Li X X, *et al.* Cloning and characterisation of NMDA receptors in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in relation to metamorphosis and catecholamine synthesis[J]. *Developmental Biology*, 2021, 469: 144-159.
- [19] Yang T Z, Gu B N, Xu G L, *et al.* Identification of candidate reference genes for qRT-PCR normalization studies of salinity stress and injury in *Onchidium reevesii*[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e6834.
- [20] Duan M L, Agerman K, Ernfors P, *et al.* Complementary roles of neurotrophin 3 and a N-methyl-D-aspartate antagonist in the protection of noise and aminoglycoside-induced ototoxicity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(13): 7597-7602.
- [21] Osumi Y, Shibata S B, Kanda S, *et al.* Downregulation of N-methyl-D-aspartate receptor  $\zeta 1$  subunit (*GluN1*) gene in inferior colliculus with aging[J]. *Brain Research*, 2012, 1454: 23-32.
- [22] Zachepilo T G, Il'Inykh Y F, Lopatina N G, *et al.* Comparative analysis of the locations of the NR1 and NR2 NMDA receptor subunits in honeybee (*Apis mellifera*) and fruit fly (*Drosophila melanogaster*, Canton-S wild-type) cerebral ganglia[J]. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 2008, 38(4): 369-372.
- [23] Ha T J, Kohn A B, Bobkova Y V, *et al.* Molecular characterization of NMDA-like receptors in *Aplysia* and *Lymnaea*: relevance to memory mechanisms[J]. *The Biological Bulletin*, 2006, 210(3): 255-270.
- [24] Colombo M N, Francolini M. Glutamate at the vertebrate neuromuscular junction: from modulation to neurotransmission[J]. *Cells*, 2019, 8(9): 996.
- [25] 吴羽媛, 梁海鹰, 吴家树, 等. 马氏珠母贝NR1基因的克隆、序列分析与表达研究[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(10): 4234-4243.
- Wu Y Y, Ling H Y, Wu J S, *et al.* Cloning, sequence analysis and expression studies on *PmNR1* gene from *Pinctada martensii*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(10): 4234-4243 (in Chinese).
- [26] Peng C, Zhao X G, Liu S X, *et al.* Effects of anthropogenic sound on digging behavior, metabolism,  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  ATPase activity, and metabolism-related gene expression of the bivalve *Sinonovacula constricta*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24266.
- [27] 梁威, 吴容宇, 严彩瑞, 等. 低频声波频率下瘤背石磺 *CaM-like*、*CaMKII*基因的表达及功能[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(2): 166-176.
- Liang W, Wu R Y, Yan C R, *et al.* Expression of *CaM-like* and *CaMKII* genes in *Onchidium reevesii* under low frequency sound wave stimulation[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(2): 166-176 (in Chinese).
- [28] 杨铁柱, 饶榕城, 黄笑含, 等. 瘤背石磺磷脂酶C基因的克隆及在不同声波刺激下的表达[J]. *上海海洋大学学报*, 2022, 31(1): 29-38.
- Yang T Z, Rao R C, Huang X H, *et al.* Cloning and expression of the phospholipase C gene in *Onchidium reevesii* under different frequency sound wave stimulation[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, 31(1): 29-38 (in Chinese).
- [29] Carlson S L, Fieber L A. Physiological evidence that D-aspartate activates a current distinct from ionotropic glutamate receptor currents in *Aplysia californica* neurons[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2011, 106(4): 1629-1636.
- [30] 刘杰, 黄金田. 瘤背石磺产卵规律与天文潮汐关系[J]. *上海海洋大学学报*, 2018, 27(1): 73-78.
- Liu J, Huang J T. The relationship between *Onchidium struma*'s spawning regularity and astronomical tides[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2018, 27(1): 73-78 (in Chinese).

## Cloning, sequence analysis of the *NR1* gene of *Onchidium reevesii* and low frequency sound stimulation on gene expression

QIAN Chang<sup>1,2,3</sup>, XIAO Haiming<sup>1,2,3</sup>, CHEN Xilin<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Xiaoming<sup>1,2,3</sup>,  
TU Zhihan<sup>1,2,3</sup>, SHEN Heding<sup>1,2,3\*</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

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

**Abstract:** NMDA receptors (N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR) are members of ionotropic glutamate receptor family, widely distributed in central nervous system, and play a pivotal role in auditory pathway. *NR1* is the fundamental subunit necessary for the NMDAR complex. The life activities of *Onchidium reevesii* are closely related to tidal cycles. In this study, we used low-frequency sound to stimulate the *O. reevesii* and investigated the expression of *NR1* receptor gene in its ganglion. The *NR1* gene's cDNA sequence was cloned using RACE-PCR on nervous tissue from *O. reevesii*, followed by bioinformatics analysis and qRT-PCR experiments. We then stimulated *O. reevesii* in the laboratory by simulating the low-frequency sounds of the tides, and measured *NR1* gene expression under different frequencies of sound stimulation. The full-length cDNA sequence of *NR1* gene was 2 434 bp, comprising a 357 bp 5'non-coding region, a 184 bp 3'non-coding region, and a 1 893 bp open reading frame encoding 630 amino acids. The cloned receptors contain a signal peptide, predicted binding sites for glycine and glutamate, a recognized transmembrane region. Multi-sequence alignment revealed high conservation of *NR1* across species. A phylogenetic tree indicated that the *NR1* gene of *O. reevesii* is related to that of *Aplysia californica*, aligning with traditional morphological classification. The results of qRT-PCR showed that *OrNR1* was expressed in different tissues, but the relative expression level in ganglion was significantly higher than that in other tissues, followed by the pleopod and liver, and the expression level in the mouthparts and dorsal skin were low ( $P<0.05$ ). The expression level of *OrNR1* was higher than the control group at 200 and 160 Hz ( $P<0.05$ ); the expression of *OrNR1* gene was inhibited at 120 Hz, the expression levels of different frequencies were significantly differently ( $P<0.05$ ). We hypothesize that the *OrNR1* gene plays an important role in the low-frequency sound perception of *O. reevesii*.

**Key words:** *Onchidium reevesii*; *OrNR1*; low frequency sound wave; tidal rhythm; gene cloning

**Corresponding author:** SHEN Heding. E-mail: [hdshen@shou.edu.cn](mailto:hdshen@shou.edu.cn)

**Funding projects:** Shanghai Collaborative Innovation (A1-3605-21-000202)