

虾夷扇贝 *AMPK* 基因家族的鉴定及表达

吕珍立¹, 黄晓文¹, 孙凤芝¹, 邢强¹, 王静^{1,2,3},
刘平平^{1,3}, 安行健⁴, 吕佳^{1,2,3*}

(1. 中国海洋大学, 海洋生物遗传与育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 中国海洋大学, 方宗熙海洋生物进化与发育研究中心, 山东 青岛 266003;

3. 青岛海洋科学与技术国家试点实验室, 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266237;

4. 中国海洋大学, 海洋生命科学实验教学中心, 山东 青岛 266003)

摘要: 为了解 *AMPK* 基因家族在虾夷扇贝中的特征、进化及生物学功能, 实验采用比较基因组学及生物信息学的方法对虾夷扇贝 *AMPK* 基因家族进行了鉴定、基因与蛋白结构分析、系统发生分析以及时空表达分析, 通过虾夷扇贝亚致死温度胁迫实验, 研究了 *AMPK* 基因家族在高温胁迫时的表达规律。结果显示, 虾夷扇贝基因组中共存在 3 个 *AMPK* 家族基因, 即 *PyAMPK α* 、*PyAMPK β* 、*PyAMPK γ* 。时空表达分析发现, *PyAMPK* 的 3 个家族基因在 D 型幼虫期之前均呈现较高的表达量, 其中 *PyAMPK α* 基因在受精卵时期表达量最高, *PyAMPK β* 基因在囊胚时期表达量最高, *PyAMPK γ* 基因在受精卵和 2~8 细胞时期的表达量达到最高水平。*PyAMPK* 在虾夷扇贝成体器官中呈现不同的表达模式, 其中肾脏表达量最高, 其次是鳃。受高温胁迫后, 肾脏和鳃中的 *PyAMPK* 基因短时间内呈现显著的上调表达, 并随着时间延长呈现先上升后下降的趋势。研究表明, *AMPK* 基因家族参与了虾夷扇贝早期胚胎发育过程的能量代谢调节以及机体面对高温胁迫的应激调节过程。本研究有助于理解贝类 *AMPK* 基因的功能和进化, 并为深入阐明贝类应对高温胁迫时的能量调节机制提供理论基础。

关键词: 虾夷扇贝; *AMPK* 基因家族; 基因鉴定; 表达分析; 高温胁迫

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

5'单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (5'-AMP-activated protein kinase, AMPK) 是真核生物细胞内的一种重要的异源三聚体蛋白。它能够感受细胞内 ATP 的含量水平, 通过将多种代谢途径的关键蛋白磷酸化, 减少 ATP 消耗的同时促进 ATP 的合成, 从而维持细胞内 ATP 的含量水平^[1]。故 AMPK 又被称为“细胞能量代谢的调节器”^[2]。真核细胞中的多种代谢途径受到 AMPK 的调控。它能够抑制

多种代谢途径以减少 ATP 的消耗。如通过抑制乙酰辅酶 A 羧化酶降低脂质的合成反应^[3-4]、抑制糖原合成酶阻止糖原的形成和存贮^[5]、抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 以降低蛋白质合成^[6-7] 等。AMPK 还可以通过促进大分子的分解产生 ATP, 如促进葡萄糖的转运和利用^[8-9]、动员存储的脂质^[10]、通过自噬效应推动大分子的转化^[11] 和促进游离的脂肪酸进入线粒体分解利用^[12-13] 等。

收稿日期: 2022-09-24 修回日期: 2022-10-26

资助项目: 国家自然科学基金 (32102778); 中国博士后科学基金 (2021M693024); 山东省重点研发计划项目 (2021ZLGX03)

第一作者: 吕珍立 (照片), 从事海洋生物学研究, E-mail: lvzhenli1997@163.com

通信作者: 吕佳, 从事贝类分子遗传研究, E-mail: lvjia@ouc.edu.cn



另外, AMPK 还通过调控线粒体的稳态实现对 ATP 含量水平的调节, 具体表现在促进线粒体的发生^[14]、对线粒体动力学的调控^[15]、促进自噬与线粒体自噬以提高线粒体质量^[16]等。AMPK 在真核细胞能量代谢的调控中发挥了重要作用。

真核细胞中的 AMPK 结构十分保守, 由 3 个同源亚基 α 、 β 和 γ 组成 (图 1)。其中 α 亚基是 AMPK 的催化亚基, 在其 N 端包含 1 个传统的激酶结构域和 1 个关键的磷酸化位点 Thr172。 β 和

γ 亚基是 AMPK 的调节亚基^[17]。 β 亚基是 AMPK 复合体的结构核心^[18], 包含 1 个碳水化合物结合模块 (CBM)。 γ 亚基包含有 4 个串联的胱硫氨酸- β -合酶 (CBS) 结构域, 可以感知细胞内 AMP/ATP 的水平。当细胞内的 ATP 含量水平较低时, AMP 或 ADP 与 γ 亚基结合引起变构效应, 以保护 Thr172 免受磷酸酶的影响, 从而起到促进 AMPK 活性的作用^[19]。

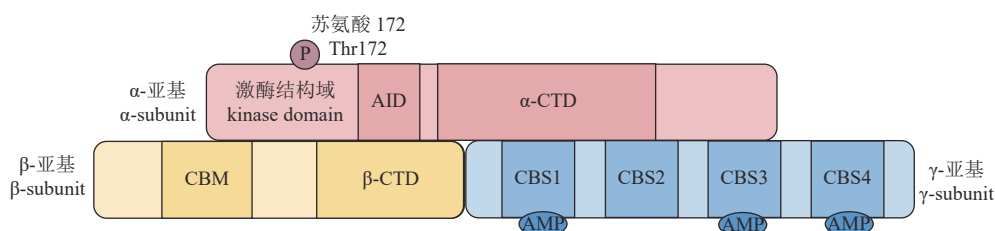


图 1 5'单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMPK) 三聚体结构

AID: 自抑制结构域, α -CTD: α -亚基羧基端结构域, CBM: 碳水化合物结合模块, β -CTD: β 亚基羧基端结构域, CBS: 胱硫氨酸 β 合酶。

Fig. 1 Domain structure of the AMP-activated protein kinase (AMPK) trimer

AID: auto-inhibitory domain, α -CTD: α -subunit carboxy-terminal domain, CBM: carbohydrate-binding module, β -CTD: β -subunit carboxy-terminal domain, CBS: cystathionine β -synthase.

作为机体能量代谢的调节器, AMPK 基因参与了海洋贝类应对压力时的响应和调节, 在高温、盐度等胁迫条件下, 机体会调动能量储备, 以满足免疫调节所需的能量要求^[20]。有研究表明, 嫁蛾 (*Cellana toreuma*) 在受到环境的高温胁迫时, AMPK 基因的表达会发生显著上调以提高对环境的耐受度^[21]。斑马贻贝 (*Dreissena polymorpha*) 在高温应激时, 能量供应受到影响, 此时 AMPK 蛋白活性显著上升以恢复能量平衡^[22]。虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 是我国重要的水产贝类, 属于冷水贝, 最适的生长温度为 10~18 °C。夏季海水温度上升带来的高温胁迫是虾夷扇贝夏季大面积死亡的重要原因之一。研究表明, 高温胁迫下虾夷扇贝的耗氧率和排氨率都显著增加, 机体的能量代谢发生显著变化^[23]。但目前对虾夷扇贝中还缺乏对 AMPK 基因系统的调查和分析。开展虾夷扇贝 AMPK 基因的鉴定和研究, 有助于深入了解其应对高温胁迫时的能量调节机制, 为虾夷扇贝良种选育与养殖提供理论基础。因此, 本研究开展了虾夷扇贝的全基因组 AMPK 基因的筛查, 分析了其基因与蛋白结构、系统发生关系、时空表达模式等, 并进一步分析了 AMPK 基因在面对高温胁迫时的应答规律, 以期为深入理解 AMPK 的基因家族的进化、功能以及压力响应下的能量

代谢调控提供参考。

1 材料与方法

1.1 AMPK 基因家族的筛查与鉴定

在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库和 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 数据库中下载代表性脊椎动物 [人 (*Homo sapiens*)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)] 和无脊椎动物 [长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)] 的 AMPK 基因家族全长蛋白序列 (表 1)。使用 tblastn 将以上蛋白序列与虾夷扇贝的基因组和转录组进行比对以鉴定 AMPK 家族基因 ($e < 1 \times 10^{-5}$)^[24]。同时利用 HMMER 软件对获得的序列构建相应的 AMPK 基因家族 hmm 模型, 再次进行筛选。最终得到 AMPK 基因家族的候选基因。

1.2 序列分析

将 AMPK 基因家族序列提交至 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 以预测候选基因的开放阅读框 (ORF) 以及氨基酸序列。使用 SMART^[25] (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 识别 AMPK 蛋白的保守结构域, 利用 Compute Pi/Mw^[26] (https://web.expasy.org/compute_pi/) 工具计算 AMPK

表 1 分析所用蛋白序列登录号

Tab. 1 Accession numbers of proteins used for analysis

| 物种 species | 基因 gene | 登录号 accession number | 物种 species | 基因 gene | 登录号 accession number | |
|--|--|--|--------------------------------------|--------------------------------|--|----------------|
| 人 <i>H. sapiens</i> | <i>AMPK-α1</i> | Q13131 | 文昌鱼 <i>Branchiostoma floridae</i> | <i>AMPK-α</i> | XP_035698911.1 | |
| | <i>AMPK-α2</i> | P54646 | | <i>AMPK-β</i> | XP_035671484.1 | |
| | <i>AMPK-β1</i> | Q9Y478 | | <i>AMPK-γ</i> | XP_035688372.1 | |
| | 小鼠 <i>Mus musculus</i> | <i>AMPK-β2</i> | O43741 | 栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i> | <i>AMPK-α</i> | A0A5P8NF96 |
| | | <i>AMPK-γ1</i> | P54619 | | <i>AMPK-β</i> | A0A5P8NFK1 |
| | | <i>AMPK-γ2</i> | Q9UGJ0 | | <i>AMPK-γ</i> | QFR39802.1 |
| | | 非洲爪蟾 <i>X. laevis</i> | <i>AMPK-γ3</i> | Q9UGI9 | 长牡蛎 <i>C. gigas</i> | <i>AMPK-α</i> |
| <i>AMPK-α1</i> | | | Q5EG47 | <i>AMPK-β</i> | | XP_011450447.2 |
| <i>AMPK-α2</i> | | | Q8BRK8 | <i>AMPK-γ</i> | | XP_034310778.1 |
| 斑马鱼 <i>D. rerio</i> | | | <i>AMPK-β1</i> | Q9R078 | 厚壳贻贝 <i>Mytilus coruscus</i> | <i>AMPK-α</i> |
| | <i>AMPK-β2</i> | | Q6PAM0 | <i>AMPK-β</i> | | CAC5380486.1 |
| | <i>AMPK-γ1</i> | | O54950 | <i>AMPK-γ</i> | | CAC5394159.1 |
| | 尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i> | | <i>AMPK-γ2</i> | Q91WG5 | 福寿螺 <i>Pomacea canaliculata</i> | <i>AMPK-α</i> |
| | | <i>AMPK-γ3</i> | Q8BGM7 | <i>AMPK-β</i> | | XP_025106003.1 |
| | | <i>AMPK-α1</i> | Q5U5E3 | <i>AMPK-γ</i> | | XP_025093941.1 |
| | | 大堡礁海绵 <i>Amphimedon queenslandica</i> | <i>AMPK-α2</i> | A0A1L8GFI4 | 双斑蛸 <i>Octopus bimaculoides</i> | <i>AMPK-α</i> |
| <i>AMPK-β1</i> | | | A0A1L8I0A7 | <i>AMPK-β</i> | | XP_014774820.1 |
| <i>AMPK-β2</i> | | | Q7SZ97 | <i>AMPK-γ</i> | | XP_014770238.1 |
| 柱状珊瑚 <i>Stylophora pistillata</i> | | | <i>AMPK-γ1</i> | A0A1L8H9N3 | 绿叶海蜗牛 <i>Elysia chlorotica</i> | <i>AMPK-α</i> |
| | <i>AMPK-γ2</i> | | B2GU31 | <i>AMPK-β</i> | | RUS79873.1 |
| | <i>AMPK-γ3</i> | | A9JS54 | <i>AMPK-γ</i> | | RUS91803.1 |
| | 光滑双脐螺 <i>Biomphalaria glabrata</i> | | <i>AMPK-α1</i> | A5WUM0 | 光滑双脐螺 <i>Biomphalaria glabrata</i> | <i>AMPK-α</i> |
| | | <i>AMPK-α2</i> | E7F9C4 | <i>AMPK-β</i> | | XP_013086198.1 |
| | | <i>AMPK-β1</i> | Q6NY31 | <i>AMPK-γ</i> | | XP_013080698.1 |
| | | 大堡礁海绵 <i>Amphimedon queenslandica</i> | <i>AMPK-β2</i> | B3DLH3 | 柱状珊瑚 <i>Stylophora pistillata</i> | <i>AMPK-α</i> |
| <i>AMPK-γ1</i> | | | Q6PCS7 | <i>AMPK-β</i> | | XP_022785483.1 |
| <i>AMPK-γ2</i> | | | F1QRT4 | <i>AMPK-γ</i> | | PFX28666.1 |
| 大堡礁海绵 <i>Amphimedon queenslandica</i> | | | <i>AMPK-γ3</i> | F1QK10 | 大堡礁海绵 <i>Amphimedon queenslandica</i> | <i>AMPK-α</i> |
| | <i>AMPK-α1</i> | | NP_001306797.1 | <i>AMPK-β</i> | | XP_003386563.1 |
| | <i>AMPK-α2</i> | | NP_001306798.1 | <i>AMPK-γ</i> | | XP_011407664.2 |
| | 大堡礁海绵 <i>Amphimedon queenslandica</i> | | <i>AMPK-β1</i> | XP_003440152.1 | | |
| | | <i>AMPK-β2</i> | XP_005476249.1 | | | |
| | | <i>AMPK-γ2</i> | XP_005460990.1 | | | |
| | | <i>AMPK-γ3</i> | XP_025755940.1 | | | |

蛋白的理论等电点和分子质量。使用 SOAPMA (<http://www.prabi.fr/>) 在线工具进行二级结构预测并使用 geneious primer 进行绘制, SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) 在线工具预测蛋白的三级结构。使用 IBS1.0.3^[27] (<http://ibs.biocuckoo.org/>) 展示基因结构和蛋白质结构。

1.3 系统发生树构建

在 NCBI 数据库和 Uniprot 数据库中下载人、小鼠 (*Mus musculus*)、非洲爪蟾、斑马鱼、尼罗罗非鱼、文昌鱼、双斑蛸、光滑双脐螺、绿叶海蜗牛、福寿螺、栉孔扇贝、长牡蛎、厚壳贻贝、柱状珊瑚和大堡礁海绵共 15 种动物的 AMPK 蛋白

全长序列 (表 1), 与鉴定到的虾夷扇贝 AMPK 蛋白全长序列共同用于系统发生树的构建。使用 MEGA14 软件^[28] 中的 ClustalW 方法^[29] 进行多序列比对, 使用 NJ 方法对 AMPK α 、AMPK β 、AMPK γ 进行系统发生树构建, Bootstrap 法进行重复检验, 重复 1 000 次。使用 iTOL 进行优化与展示。

1.4 虾夷扇贝 AMPK 基因家族时空表达分析

从已发表的虾夷扇贝各个发育时期 (受精卵、2~8 细胞期、囊胚期、原肠胚期、担轮幼虫期、D 型幼虫期、壳顶幼虫前期、壳顶幼虫中期、壳顶幼虫后期、匍匐幼虫期、稚贝) 及各个成体组织 (外套膜、鳃、肾脏、足、眼、雌性性腺、雄性性腺、肝胰腺、横纹肌、平滑肌) 的转录组数据^[30] 中计算得到 AMPK 家族基因的表达量 TPM (transcript per million), 使用 R 软件包进行可视化作图, 以分析 AMPK 家族各成员的时空表达模式。

1.5 高温胁迫实验

利用活性较好的 40 只 2 龄虾夷扇贝个体进行温度胁迫实验。实验前, 将所有个体随机平分至 2 个 0.6 m×0.4 m×0.4 m 养殖水箱中分开暂养 3 d, 使其适应实验室养殖环境, 期间水温维持在 10 °C, 每天换水 1/2, 投喂扁藻等单胞藻, 投饵量为 5×10⁴ 个/mL。实验时, 将 2 个平行组个体由 10 °C 暂养水体分别同时迅速转移至 2 个 23 °C 水体中^[31] (期间不进行投喂和换水, 保持充足供氧)。在温度骤变后的 0、3、6、12 和 24 h 分别从 2 个平行组中随机取 3 只虾夷扇贝, 迅速解剖并收集其鳃、肾脏, 组织分离后立刻使用液氮冷冻, -80 °C 保存, 以备总 RNA 的提取。实验过程中操作人员严格遵守中国海洋大学伦理规范, 并按照中国海洋大学伦理委员会指定的规章制度执行。

1.6 RNA 提取和实时定量 PCR (qPCR) 分析

根据实验室前期发表的总 RNA 提取方法^[32], 提取虾夷扇贝鳃、肾脏的总 RNA。使用莫洛尼鼠白血病病毒 (MMLV) 逆转录酶合成第一链 cDNA 作为 qPCR 的反应模板, 因 EF1A 在虾夷扇贝各组织中的表达稳定, 故使用 EF1A 作为内参基因^[33-34], 所有引物使用 Primer Premier 5.0 软件进行设计 (表 2)。所设计的引物使用 BLASTN (1×10⁻¹⁰) 与虾夷扇贝基因组进行比对以验证其特异性。

将 cDNA 溶液稀释至 10 ng/ μ L, 取 2 μ L 作为反应模板, 加入 10 μ L SYBY Green I Real-time

表 2 虾夷扇贝 AMPK 基因及内参基因引物序列

Tab. 2 Sequences of primers for AMPK genes and internal reference genes of *P. yessoensis*

| 基因名称 gene ID | 引物序列(5'-3') primer sequences (5'-3') |
|--------------------|---|
| PyAMPK α -F | AGAGCCCAAAGTCAGCTA |
| PyAMPK α -R | CAAGTTAAAGGAGCCAGAA |
| PyAMPK β -F | CCGCTCGCCAAAAGCCAT |
| PyAMPK β -R | CTCACCGCCGTGTATCCA |
| PyAMPK γ -F | ACCGATCATCACAAGTTACTGAAC |
| PyAMPK γ -R | AGATTAAGCAGGGTATCAAAGATG |
| EF1A-R | GTTACGTTACAGCCTTCAGT |
| EF1A-F | GCGGTGGTATTGACAAGAGA |

PCR Master Mix, 上、下游引物 (2 μ mol/L) 各 4 μ L, 最终得到 20 μ L 的反应体系。使用 LightCycler 480 实时定量 PCR 仪 (Roche) 进行扩增。反应程序: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 53 °C 60 s, 40 个循环; 95 °C 15 s, 1 个循环。进一步通过熔解曲线验证引物特异性, 使用 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} 的方法计算 AMPK 基因的相对表达量。基于各基因的相对表达水平, 使用 SPSS 软件进行数据的统计分析, 使用独立 *t* 检验的统计软件包, 分析各 AMPK 基因表达变化的规律。

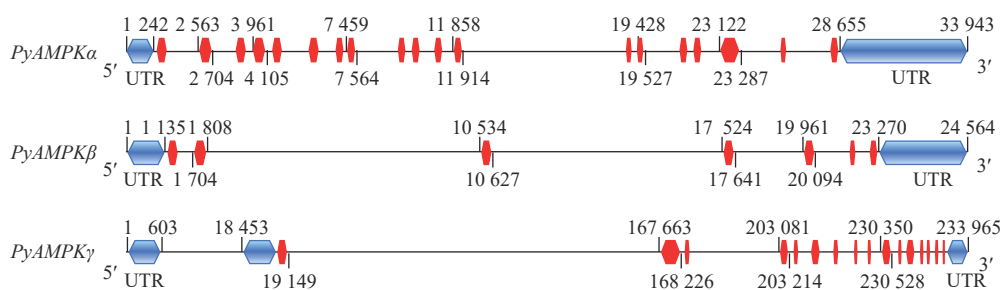
2 结果

2.1 虾夷扇贝 AMPK 基因的鉴定和结构分析

虾夷扇贝基因组中共鉴定出 3 个 AMPK 基因, 分别为 PyAMPK α 、PyAMPK β 、PyAMPK γ (表 3), 即组成 AMPK 所必需的 3 个亚基所对应的基因。其开放阅读框长度分别为 1 689、777 和 1 911 bp。PyAMPK α 、PyAMPK β 、PyAMPK γ 基因分别有 19、7 和 16 个外显子, 分别编码 562、258 和 636 个氨基酸 (图 2, 表 3)。鉴定得到的 3 个 AMPK 蛋白的分子质量差别较大, 预测值分别为 63.75、28.80 和 72.22 ku, 等电点 (PI) 的预测值分别为 6.21、7.17 和 8.98。二级结构的预测结果显示, 这些蛋白分别含有 24、5 和 31 个 α 螺旋, 20、12 和 17 个 β 折叠, 16、4 和 14 个 β 转角以及 36、16 和 46 个无规则卷曲, 其三级结构预测如图 3 所示。3 个 AMPK 蛋白分别具有其亚族特有的蛋白保守结构域: AMPK α 具有一个激酶结构域 S_{TKc}、一个自抑制结构域 α -AID 和一个链接结构域 α -CTD, AMPK β 具有一个碳水化合物结合区域 CBM 和一

表 3 虾夷扇贝 *AMPK* 基因家族特征总结Tab. 3 Summary of characteristics of *AMPK* family genes in *P. yessoensis*

| 参数 parameter | 基因名称 gene ID | | |
|---|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | <i>PyAMPKα</i> | <i>PyAMPKβ</i> | <i>PyAMPKγ</i> |
| 总长/bp total length | 33 943 | 24 564 | 331 224 |
| 5'UTR长度/bp 5'UTR length | 242 | 393 | 1 135 |
| 3'UTR长度/bp 3'UTR length | 5 289 | 1 293 | 581 |
| ORF长度/bp ORF length | 1 689 | 777 | 1 911 |
| 氨基酸序列长度 amino acid length | 562 | 258 | 636 |
| 分子量/ku molecular weight | 63.75 | 28.80 | 72.22 |
| 理论PI值 theoretical PI | 6.21 | 7.17 | 8.98 |
| 外显子数量/个 number of exons | 19 | 7 | 16 |
| 内含子数量/个 number of introns | 18 | 6 | 16 |
| α 螺旋数/个 α number of alpha helix | 24 | 5 | 31 |
| β 折叠数/个 β number of beta strand | 20 | 12 | 17 |
| 无规则卷曲数/个 number of random coil | 36 | 16 | 46 |
| β 转角数/个 number of β turn | 16 | 4 | 14 |

图 2 虾夷扇贝 *AMPK* 家族基因结构

红色框表示外显子，黑色实线表示内含子，蓝色框表示非翻译区 (UTRs)。

Fig. 2 Structure of *AMPK* family genes in *P. yessoensis*

Red boxes indicate exons, solid black lines indicate introns, blue boxes indicate untranslated regions (UTRs).

个链接结构域 β -CTD, *AMPK γ* 具有 4 个串联的胱硫醚- β -合酶 (CBS) 重复序列 (图 4)。

2.2 虾夷扇贝 *AMPK* 基因的系统发生分析

系统发生树的结果显示, *AMPK* 基因的进化关系明确 (图 5)。 *AMPK* 基因家族的 3 个亚基分别形成了相对独立的进化支, 且每个亚基中脊椎动物与无脊椎动物也分别产生了明显的独立进化支。其中, 脊椎动物的 *AMPK α* 普遍存在 2 个亚型 ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$), *AMPK β* 存在 2 个亚型 ($\beta 1$ 、 $\beta 2$), *AMPK γ* 存在 3 个亚型 ($\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$), 都按照亚型分类聚在一起。无脊椎动物各亚基只有 1 个亚型, 其中软体动物形成了相对独立的进化支, 虾夷扇贝 3 个 *AMPK* 家族基因都与栉孔扇贝的 *AMPK* 家族基因具有最近的亲缘关系, 并与长牡蛎、厚壳贻贝等

双壳纲 (Bivalvia) 贝类也存在相对较近的亲缘关系。

2.3 *AMPK* 基因时空表达分析

基于虾夷扇贝胚胎发育时期的转录组数据分析显示, 3 个亚基因分别在 D 型幼虫时期及之前呈现不同水平的高表达, 其中 *AMPK α* 基因主要在幼虫发育前期相对高表达, 覆盖受精卵时期到 D 型幼虫时期, 其中受精卵时期表达量最高, 而到达壳顶幼虫时期之后其表达量迅速下降 (图 6-a)。 *AMPK β* 基因也是在受精卵至 D 型幼虫时期有相对较高的表达量, 其中在原肠胚阶段其表达量达到了最高水平, 同样到达壳顶幼虫时期后, 其表达量迅速下降。 *AMPK γ* 基因在受精卵和 2~8 细胞期的表达量达到最高水平, 之后只有担轮幼虫时期的表达量有所上升, 其他时期的表达

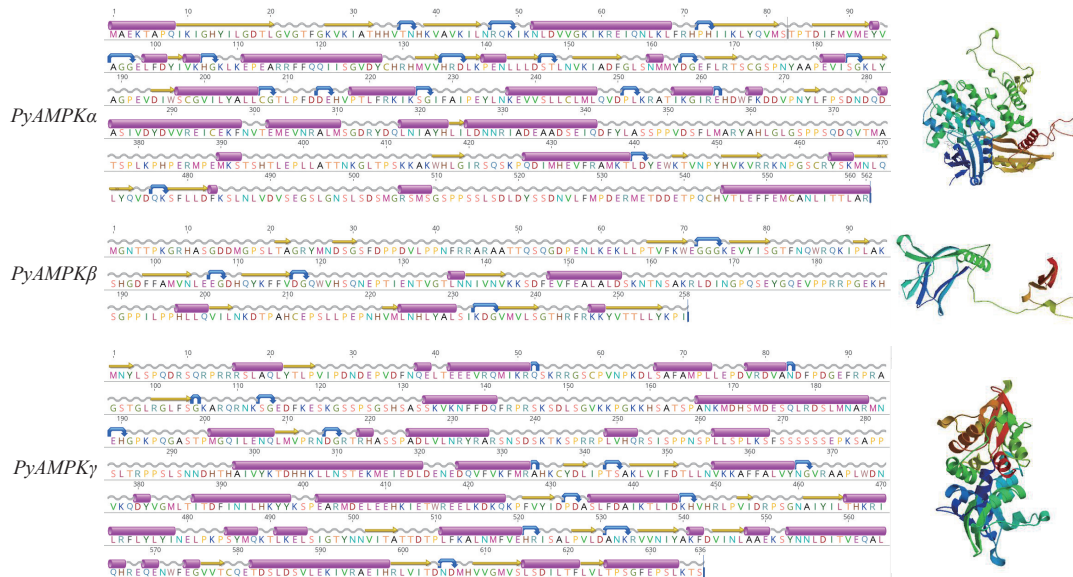


图 3 虾夷扇贝 AMPK 蛋白二级结构及三级结构预测

粉色圆柱表示 α 螺旋, 黄色箭头表示 β 折叠, 蓝色弯曲箭头表示 β 转角, 灰色波浪线表示无规则卷曲。

Fig. 3 Secondary and tertiary structure prediction of AMPK proteins in *P. yessoensis*

Pink cylinders represent alpha helices, yellow arrows represent beta strands, blue curved arrows represent beta turns, gray wavy lines represent random coils.

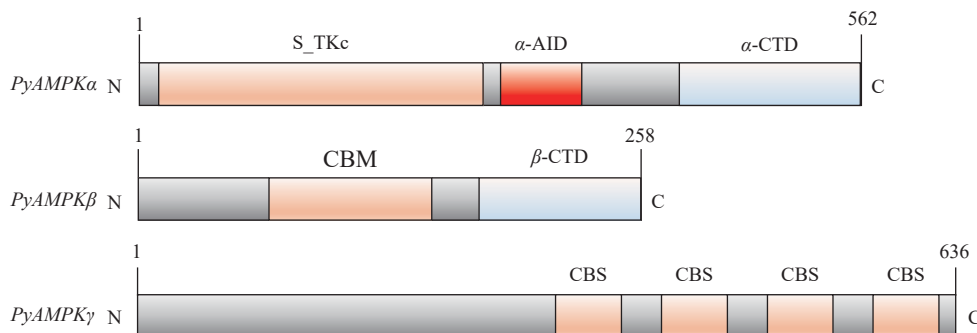


图 4 虾夷扇贝 AMPK 蛋白结构域

S_TKc. 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化结构域, α -AID. α -自抑制结构域。

Fig. 4 Structure of the *P. yessoensis* AMPK proteins

S_TKc. serine/threonine protein kinases catalytic domain, α -AID. α -auto-inhibitory domain.

量都相对较低。

对 AMPK 家族基因在虾夷扇贝 10 种组织中的表达情况进行分析, 3 个基因在不同组织中均呈现不同的表达模式, 其中 AMPK α 基因在鳃、肾脏、眼、雌性性腺中具有相对较高的表达, 其中肾脏的表达量最高, 是其他组织的 1.24~5.00 倍(图 6-b)。AMPK β 基因在外套膜、鳃、肾脏、眼中具有相对较高的表达量, 与 AMPK α 基因相同, 其在肾脏中具有最高的表达水平。AMPK γ 基因的组织表达模式与其他 2 个基因有明显差异, 在鳃与雌性性腺中呈现最高的表达量, 在雄性性腺和肝胰腺中的相对表达量高于其他 2 个基因。

值得注意的是, AMPK 家族基因在雌性性腺中的整体表达量都高于雄性性腺。

2.4 温度胁迫条件下 AMPK 基因表达分析

本研究采用 qPCR 法, 检测了虾夷扇贝受高温胁迫后 24 h 内 5 个时间点的 AMPK 基因的表达量(图 7), 其中误差线表示 $\text{mean} \pm \text{SE}$ ($n=6$)。结果显示, 在肾脏中, AMPK α 基因在高温胁迫 3 h 时发生上调, 相对表达量达到最高(为对照组的 2.9 倍), 之后相对表达量下降且均低于对照组, 到达 24 h 时表达量再次上调。AMPK β 基因在 3 h 时表达上调, 之后表达量下降, 并且相对表达量

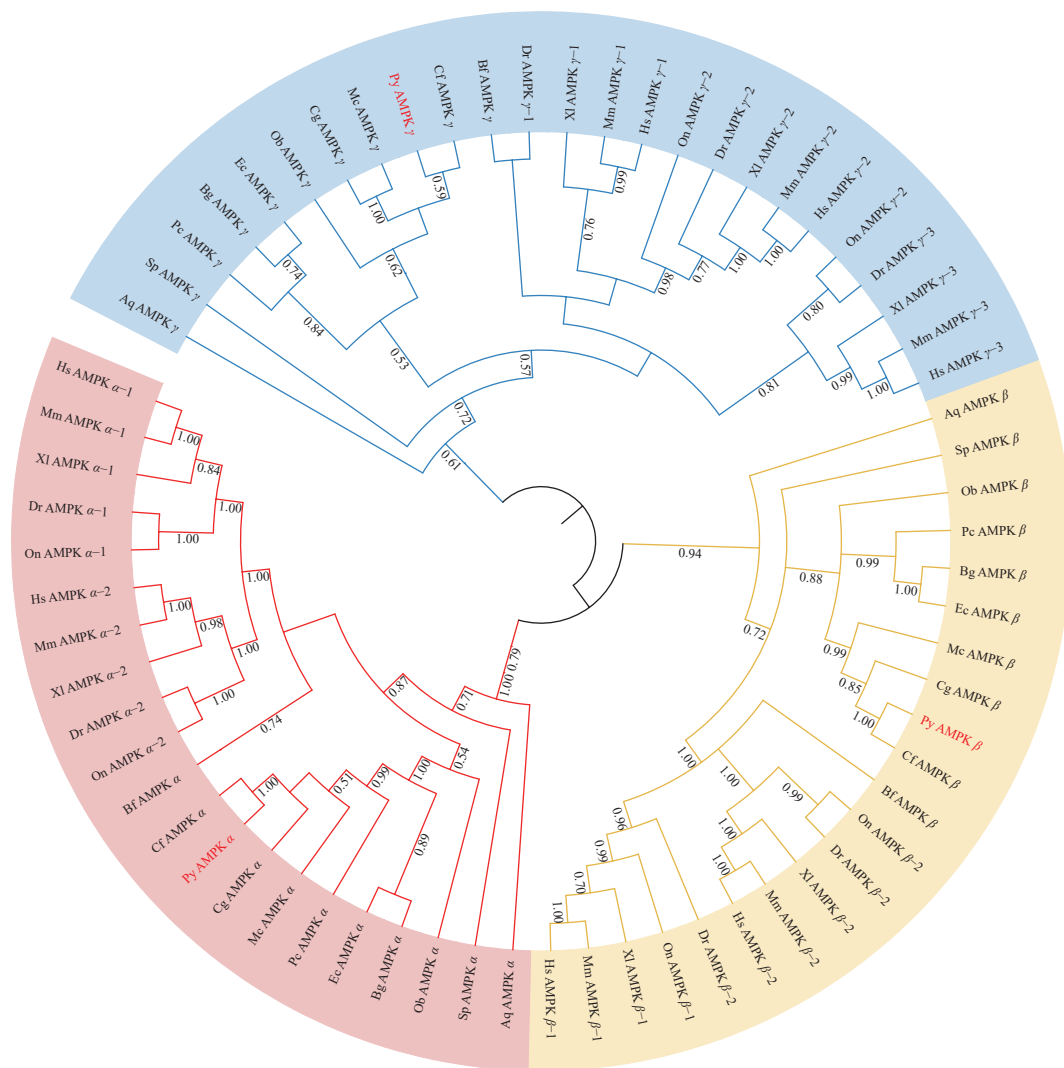


图 5 16 物种 AMPK 基因家族系统发生树

红色范围代表 AMPK α 亚基, 黄色范围代表 AMPK β 亚基, 蓝色范围代表 AMPK γ 亚基; Hs. 人, Mm. 小鼠, XI. 爪蟾, On. 尼罗罗非鱼, Dr. 斑马鱼, Bf. 文昌鱼, Cf. 栉孔扇贝, Py. 虾夷扇贝, Cg. 长牡蛎, Mc. 厚壳贻贝, Pc. 福寿螺, Ec. 绿叶海蜗牛, Bg. 光滑双脐螺, Ob. 双斑蛸, Sp. 柱状珊瑚, Aq. 大堡礁海绵。

Fig. 5 Phylogenetic tree of AMPK in 16 species

Red range represents AMPK α subsets, yellow range represents AMPK β subsets, blue range represents AMPK γ subsets; Hs. *H. sapiens*, Mm. *M. musculus*, XI. *X. laevis*, On. *O. niloticus*, Dr. *D. rerio*, Bf. *B. floridae*, Cf. *C. farreri*, Py. *P. yessoensis*, Cg. *C. gigas*, Mc. *M. coruscus*, Ec. *E. chlorotica*, Bg. *B. glabrata*, Ob. *O. bimaculoides*, Sp. *S. pistillata*, Aq. *A. queenslandica*.

均显著低于对照组 (6、12 h 时 $P < 0.05$, 24 h 时 $P < 0.01$)。AMPK γ 基因在高温胁迫 3 h 时上调最为显著 (为对照组的 3.90 倍, $P < 0.05$), 随后表达量有所下降, 24 h 时相对表达量再次显著上调 ($P < 0.05$), 且所有时间点的相对表达量均高于对照组。在鳃中, AMPK α 基因在高温胁迫 3 h 时显著上调达到最高值 (为对照组的 1.5 倍, $P < 0.05$), 随后表达量开始下降, 12 和 24 h 时相对表达量均低于对照组。AMPK β 基因相对表达量在 3 h 时首先呈现出下降趋势, 之后上调。AMPK γ 基因在 3 h 时发

生显著上调 ($P < 0.05$), 并且在 6 h 时相对表达量达到峰值 (为对照组的 2.76 倍), 随后表达量下降, 24 h 时低于对照组表达量。可以发现, AMPK 家族基因在受到高温胁迫后的 24 h, 都在某一时间点呈现出了表达量上升的现象, 且整体呈现先上升后下降的趋势。

3 讨论

本研究鉴定了虾夷扇贝 AMPK 基因家族的 3 个亚型基因并探究了其时空表达特征和应对高温

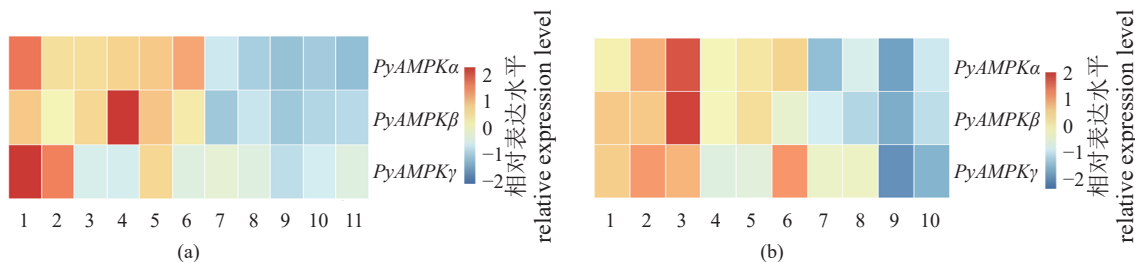


图 6 虾夷扇贝 AMPK 家族基因时空表达谱

(a) 虾夷扇贝各发育时期 AMPK 基因表达谱, 1. 受精卵, 2. 2-8 细胞期, 3. 囊胚期, 4. 原肠胚期, 5. 担轮幼虫期, 6. D 型幼虫期, 7. 壳顶幼虫前期, 8. 壳顶幼虫中期, 9. 壳顶幼虫后期, 10. 匍匐幼虫期, 11. 稚贝; (b) 虾夷扇贝成体组织 AMPK 基因表达谱, 1. 外套膜, 2. 鳃, 3. 肾脏, 4. 足, 5. 眼, 6. 雌性性腺, 7. 雄性性腺, 8. 肝胰腺, 9. 横纹肌, 10. 平滑肌。

Fig. 6 Spatiotemporal expression profiles of AMPK family genes in *P. yessoensis*

(a) AMPK gene expression profiles of *P. yessoensis* in different developmental stages, 1. fertilized egg, 2. 2-8 cell stage, 3. blastocyst stage, 4. gastrula stage, 5. trochanter stage, 6. D-shaped larval stage, 7. early-umbo larval stage, 8. middle-umbo larval stage, 9. late-umbo larval stage, 10. pediveliger larval stage, 11. juvenile scallop; (b) AMPK gene expression profile in adult tissues of *P. yessoensis*, 1. mantle, 2. gill, 3. kidney, 4. foot, 5. eye, 6. male-gland, 7. female-gland, 8. hepatopancreas, 9. striated muscle, 10. smooth muscle.

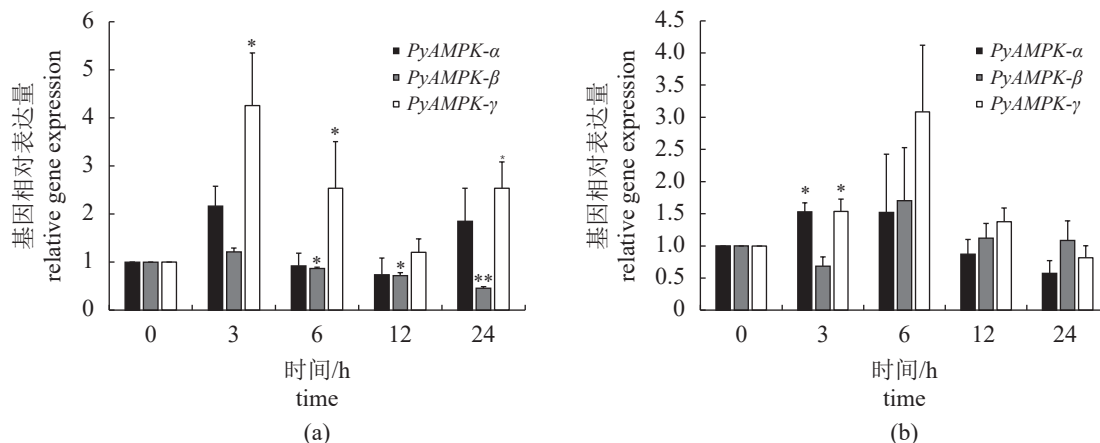


图 7 高温胁迫后 AMPK 基因表达情况

(a) 肾脏, (b) 鳃。*表示组间差异显著 ($P < 0.05$), **表示组间差异极显著 ($P < 0.01$)。

Fig. 7 Gene expression profiling of AMPK genes after heat stress treatment

(a) kidney, (b) gill. * means significant difference ($P < 0.05$), ** means extremely significant difference ($P < 0.01$).

胁迫时的表达规律。结果显示, 在 D 型幼虫时期之前, 虾夷扇贝胚胎中 AMPK α 、AMPK β 和 AMPK γ 基因都有不同程度的高表达。其中 AMPK α 和 AMPK β 都在受精卵中呈现高表达规律, 其很有可能来源于母源性 mRNA。Guévelou 等^[35]发现, 长牡蛎卵细胞成熟时发生泡破裂可能受到 AMPK 基因上调表达的调节, 这种 AMPK 高表达规律很有可能延续到胚胎发育早期。AMPK β 基因在原肠胚时期的表达量发生了大幅上升, 在这一时期母源性 mRNA 基本消耗, 基因的上调表达应该是由胚胎自身调节所产生的。同样, 实验对长牡蛎转录组数据进行分析也发现 AMPK β 在原肠胚期有着最高的表达量^[36]。原肠胚期是胚胎组织器官产生分化的关键时期, 细胞运动活跃, 需要消耗

大量的 ATP^[37]。推测 AMPK 基因在这一时期的高表达可能与该时期的胚胎发育活动有关。而 AMPK β 亚基作为构成 AMPK 三聚体的结构核心, 大量的表达对维持 AMPK 活性起到了关键作用^[18]。另有研究表明, AMPK β 亚基在调节三聚体活性方面也起到了重要的作用, 其在原肠胚期的大量表达可能印证了以上说法^[38]。

在成体组织中, AMPK α 基因和 AMPK β 基因在肾脏中表现出最高的基因表达水平, 其次是鳃组织。对虾夷扇贝的肾脏组织特异 Marker 基因进行 KEGG 富集分析结果显示^[30], 过氧化物酶体相关通路^[14]、氨基酸转运和代谢、脂肪酸转运和代谢、能量产生和转化相关通路被显著富集, 而这些通路基本上都受到 AMPK 基因的调节作用, 从

而影响机体的能量水平^[1]。Lian 等^[39]在栉孔扇贝中以 ATP 等能量代谢相关指标评估个体衰老程度时, 发现肾脏组织是最具有代表性的器官, 这表明肾脏与个体的能量代谢和稳态密切相关。而 AMPK 在虾夷扇贝肾脏的高表达和相关代谢通路的显著富集都暗示了肾脏是虾夷扇贝机体能量平衡调节的重要器官。

AMPK 在鳃中也有着较高的表达量。Wang 等^[40]发现, 在菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 中, AMPK β 和 AMPK γ 在鳃中的表达量远高于其他组织。鳃是虾夷扇贝呼吸和摄食的主要器官, 这两种生理功能会涉及到大量的能量消耗和调节^[41], 而 AMPK 作为能量调节的重要基因, 在鳃中的高表达特征与组织执行的生理功能密切相关, 同时也暗示 AMPK 基因在维持鳃组织能量稳态中发挥了重要的作用。另外, 有研究报道 AMPK 家族基因的激活在牡蛎性腺^[35]和人类肌肉^[42]中存在着性别二态性, AMPK 基因的表达参与性腺的发育周期调控。在本研究中也发现 AMPK 基因在雌性和雄性性腺中呈现不同的表达模式。

能量代谢调节是海洋生物在应对环境胁迫时机体的响应调节方式之一^[43]。个体在受到胁迫时, 会在加强产能代谢的同时, 减少生长方面的能量消耗, 以保障机体应激时的能量需求^[44]。邓伟^[45]发现在高温胁迫条件下, 多鳞白甲鱼 (*Scaphesthes macrolepis*) 肝脏和肌肉中 AMPK 基因表达上调, 增强了脂肪酸的 β 氧化、抑制脂肪酸的合成以提供能量。Lian 等^[39]发现栉孔扇贝在高温条件下, 特定组织中的糖原含量明显下降, 以供能保证机体的稳定。在本研究中, 受到高温胁迫后, 肾脏和鳃中 AMPK 家族基因都产生了不同程度的表达上调。李亚丹^[46]发现秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 在受到高温胁迫后, 会产生多种 AMPK 蛋白亚型以提高高温耐受能力。Frederich 等^[47]研究发现岩蟹 (*Cancer irroratus*) 受到亚致死的高温胁迫后, 心脏中 AMPK 表达量会快速上升以满足机体的能量需求。故推测在虾夷扇贝高温应激的状态下, 机体 ATP 的消耗量增大, AMPK 基因被激活以维持机体的能量平衡, 这可能对于虾夷扇贝抵御高温胁迫具有重要意义。而持续的高温刺激可能导致虾夷扇贝的循环系统和呼吸系统的衰竭, 使得细胞生存状态遭到破坏^[48], AMPK 基因的表达量开始下降。以上结果暗示了 AMPK 作为维持机体能量稳态的重要基因, 参与了虾夷扇贝

受到高温胁迫时的应激响应。

4 结论

本研究首次在虾夷扇贝中鉴定出 AMPK 基因家族的 3 个亚基基因 *PyAMPK α* 、*PyAMPK β* 、*PyAMPK γ* , 并系统分析了其基因结构、保守结构域、蛋白特性及系统发生关系。利用转录组数据和 qPCR 分析了其时空及热应激条件下的表达规律。结果发现, AMPK 基因可能参与了虾夷扇贝早期胚胎发育过程中的能量供应调节。AMPK 基因在肾脏和鳃中呈现高表达趋势, 推测其在维持鳃组织稳态方面发挥了重要作用, 同时暗示了虾夷扇贝的肾脏是机体能量平衡调节的重要器官。综上, AMPK 家族基因在虾夷扇贝平衡能量代谢、维持机体稳态、调节多种生理活动中都起到了重要的作用。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Herzig S, Shaw R J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19(2): 121-135.
- [2] Hardie D G, Ross F A, Hawley S A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13(4): 251-262.
- [3] Carling D, Zammit V A, Hardie D G. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis[J]. *FEBS Letters*, 1987, 223(2): 217-222.
- [4] Munday M R, Campbell D G, Carling D, et al. Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1988, 175(2): 331-338.
- [5] Bultot L, Guigas B, Von Wilamowitz-Moellendorff A, et al. AMP-activated protein kinase phosphorylates and inactivates liver glycogen synthase[J]. *Biochemical Journal*, 2012, 443(1): 193-203.
- [6] Inoki K, Zhu T Q, Guan K L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival[J]. *Cell*, 2003, 115(5): 577-590.
- [7] Gwinn D M, Shackelford D B, Egan D F, et al. AMPK

- phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint[J]. *Molecular Cell*, 2008, 30(2): 214-226.
- [8] Wu N, Zheng B, Shaywitz A, *et al.* AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1[J]. *Molecular Cell*, 2013, 49(6): 1167-1175.
- [9] Kim J H, Park J M, Yea K, *et al.* Phospholipase D1 mediates AMP-activated protein kinase signaling for glucose uptake[J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9600.
- [10] Ahmadian M, Abbott M J, Tang T Y, *et al.* Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype[J]. *Cell Metabolism*, 2011, 13(6): 739-748.
- [11] Bento C F, Renna M, Ghislat G, *et al.* Mammalian autophagy: how does it work?[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2016, 85: 685-713.
- [12] McGarry J D, Leatherman G F, Foster D F. Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1978, 253(12): 4128-4136.
- [13] Saggerson D. Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells[J]. *Annual Review of Nutrition*, 2008, 28: 253-272.
- [14] Bergeron R, Ren J M, Cadman K S, *et al.* Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis[J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2001, 281(6): E1340-E1346.
- [15] Toyama E Q, Herzig S, Courchet J, *et al.* AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress[J]. *Science*, 2016, 351(6270): 275-281.
- [16] Egan D F, Shackelford D B, Mihaylova M M, *et al.* Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy[J]. *Science*, 2011, 331(6016): 456-461.
- [17] Carling D, Mayer F V, Sanders M J, *et al.* AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(8): 512-518.
- [18] Hudson E R, Pan D A, James J, *et al.* A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias[J]. *Current Biology*, 2003, 13(10): 861-866.
- [19] Xiao B, Heath R, Saiu P, *et al.* Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase[J]. *Nature*, 2007, 449(7161): 496-500.
- [20] Zeng L, Liu B, Wu C W, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of AMPK α subunit isoform genes from *Scophthalmus maximus* responding to salinity stress[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 42(6): 1595-1607.
- [21] Dong Y W, Han G D, Huang X W. Stress modulation of cellular metabolic sensors: interaction of stress from temperature and rainfall on the intertidal limpet *Cellanotoreuma*[J]. *Molecular Ecology*, 2014, 23(18): 4541-4554.
- [22] Jost J A, Keshwani S S, Abou-Hanna J J. Activation of AMP-activated protein kinase in response to temperature elevation shows seasonal variation in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2015, 182: 75-83.
- [23] Jiang W W, Li J Q, Gao Y P, *et al.* Effects of temperature change on physiological and biochemical responses of Yesso scallop, *Patinoptecten yessoensis*[J]. *Aquaculture*, 2016, 451: 463-472.
- [24] Altschul S F, Gish W, Miller W, *et al.* Basic local alignment search tool[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215(3): 403-410.
- [25] Letunic I, Khedkar S, Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2020[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(D1): D458-D460.
- [26] Bjellqvist B, Hughes G J, Pasquali C, *et al.* The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences[J]. *Electrophoresis*, 1993, 14(1): 1023-1031.
- [27] Liu W Z, Xie Y B, Ma J Y, *et al.* IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(20): 3359-3361.
- [28] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [29] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, *et al.* Clustal W and clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [30] Wang S, Zhang J B, Jiao W Q, *et al.* Scallop genome provides insights into evolution of bilaterian karyotype and development[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2017, 1(5): 0120.

- [31] 张景山. 关于改进虾夷扇贝养殖技术的探讨[J]. *水产科学*, 1999, 18(3): 46.
Zhang J S. Study on improving the culture technology of *Patinopecten yessoensis*[J]. *Fisheries Science*, 1999, 18(3): 46 (in Chinese).
- [32] Hu X L, Bao Z M, Hu J J, *et al.* Cloning and characterization of tryptophan 2, 3-dioxygenase gene of Zhikong scallop *Chlamys farreri* (Jones and Preston 1904)[J]. *Aquaculture Research*, 2006, 37(12): 1187-1194.
- [33] Santerre C, Sourdain P, Marc N, *et al.* Oyster sex determination is influenced by temperature-first clues in spat during first gonadic differentiation and gametogenesis[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2013, 165(1): 61-69.
- [34] Li Y P, Zhang L L, Sun Y, *et al.* Transcriptome sequencing and comparative analysis of ovary and testis identifies potential key sex-related genes and pathways in scallop *Patinopecten yessoensis*[J]. *Marine Biotechnology*, 2016, 18(4): 453-465.
- [35] Guévelou E, Huvet A, Galindo-Sánchez C E, *et al.* Sex-specific regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Biology of Reproduction*, 2013, 89(4): 100.
- [36] Zhang G F, Fang X D, Guo X M, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation[J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 49-54.
- [37] Kimelman D, Griffin K J P. Mesoderm induction: a post-modern view[J]. *Cell*, 1998, 94(4): 419-421.
- [38] Sanz P, Rubio T, Garcia-Gimeno M A. AMPKbeta subunits: more than just a scaffold in the formation of AMPK complex[J]. *FEBS Journal*, 2013, 280(16): 3723-3733.
- [39] Lian S S, Wang J, Zhang L L, *et al.* Integration of biochemical, cellular, and genetic indicators for understanding the aging process in a bivalve mollusk *Chlamys farreri*[J]. *Marine Biotechnology*, 2019, 21(5): 718-730.
- [40] Wang J T, Fang L, Wu Q D, *et al.* Genome-wide identification and characterization of the AMPK genes and their distinct expression patterns in response to air exposure in the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*)[J]. *Genes & Genomics*, 2020, 42(1): 1-12.
- [41] Trevisan R, Mello D F, Delapiedra G, *et al.* Gills as a glutathione-dependent metabolic barrier in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: Absorption, metabolism and excretion of a model electrophile[J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 173: 105-119.
- [42] Roepstorff C, Thiele M, Hillig T, *et al.* Higher skeletal muscle α_2 AMPK activation and lower energy charge and fat oxidation in men than in women during submaximal exercise[J]. *The Journal of Physiology*, 2006, 574(1): 125-138.
- [43] 周凯. 高温胁迫下虾夷扇贝 GSK-3 β 调节糖代谢和细胞凋亡的功能研究 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2022.
Zhou K. Study on the function of GSK-3 β in regulating glucose metabolism and apoptosis under high temperature stress in Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*)[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2022 (in Chinese).
- [44] Adamo S A. How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity?[J]. *Animal Behaviour*, 2004, 68(6): 1443-1449.
- [45] 邓伟. 温度胁迫对多鳞白甲鱼 AMPK 介导的能量稳态及脂肪酸代谢的影响 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2019.
Deng W. Influence of temperature stress on the AMPK-mediated energy homeostasis and fatty acid metabolism in *Onychostoma macrolepis*[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2019 (in Chinese).
- [46] 李亚丹. 秀丽隐杆线虫 14-3-3 蛋白 FTT-2 及 AMPK 蛋白 AAK-2 对热抗性调控作用的研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2014.
Li Y D. The study of *C. elegans* 14-3-3 protein FTT-2 and AMPK protein AAK-2 function in heat stress resistance[D]. Xiamen: Xiamen University, 2014 (in Chinese).
- [47] Frederich M, O'Rourke M R, Furey N B, *et al.* AMP-activated protein kinase (AMPK) in the rock crab, *Cancer irroratus*: an early indicator of temperature stress[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2009, 212(Pt 5): 722-730.
- [48] 刘超, 吴富村, 林思恒, 等. 高温刺激导致虾夷扇贝死亡因素的探究[J]. *海洋科学*, 2016, 40(11): 91-98.
Liu C, Wu F C, Lin S H, *et al.* Pilot study on reasons for yesso scallop's (*Patinopecten yessoensis*) survival after heat shock[J]. *Marine Sciences*, 2016, 40(11): 91-98 (in Chinese).

Genome-wide identification and expression profiling of the *AMPK* gene family in *Patinopecten yessoensis*

LÜ Zhenli¹, HUANG Xiaowen¹, SUN Fengzhi¹, XING Qiang¹, WANG Jing^{1,2,3},
LIU Pingping^{1,3}, AN Xingjian⁴, LÜ Jia^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education,
Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Fang Zongxi Center for Marine Evo-Devo, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology,

Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China;

4. Center for Experimental Marine Biology Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: As the center of cellular energy regulation in eukaryotic cells, AMPK senses and maintains energy balance in peripheral tissues by modulating various metabolic pathways. It plays a vital role in regulating the body's physiological activities and maintaining the body's homeostasis. Although the *AMPK* gene family has been extensively studied, systematic identification and analysis of the *AMPK* gene family in *Patinopecten yessoensis* are still lacking. In order to understand the characteristics, evolution and biological function of the *AMPK* gene family in *P. yessoensis*, we conducted genome-wide identification and functional and evolutionary analysis of the *AMPK* gene family in *P. yessoensis*. We also investigated the expression profiling of the *AMPK* gene family under heat stress. The results showed that three *AMPK* genes were identified in the genome of *P. yessoensis* including *PyAMPK α* , *PyAMPK β* and *PyAMPK γ* , which were necessary subunits to form the AMPK complex. Spatiotemporal expression profiling suggested that three *AMPK* genes have relatively high expression level before the D-shaped larval stage. The *PyAMPK α* , *PyAMPK β* and *PyAMPK γ* genes exhibited the highest expression level at the fertilized egg stage, blastocyst stage, and the fertilized egg and 2-8 cell stage, respectively. *PyAMPK* had distinct expression patterns in various adult tissues with the highest expression in kidney, followed by gill. Furthermore, we found the expression levels of all three *AMPK* genes in the kidney and gill increased first and then decreased over time in the group under the heat stress. Our study results showed that the *AMPK* genes not only regulated energy balance at early embryo development in scallops, but also participated in the response to heat stress. This study would benefit for understanding the function and evolution of *AMPK* gene in molluscs, and laid the foundation for further research on the regulation mechanism in response to heat stress in molluscs.

Key words: *Patinopecten yessoensis*; *AMPK* gene family; gene identification; expression analysis; heat stress

Corresponding author: LÜ Jia. E-mail: lvjia1221@ouc.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32102778); China Postdoctoral Science Foundation (2021M693024); Key R & D Project of Shandong Province (2021ZLGX03)