



三角帆蚌 *HcCnAα* 基因克隆及维氏气单胞菌感染后的表达

龙凯¹, 孙瑜¹, 李艳红¹, 腾树君², 吴正理^{1*}

(1. 西南大学水产学院, 农业农村部长江上游水生生物多样性保护研究中心, 重庆 400715;

2. 潼南区农业科技推广中心, 重庆 402660)

摘要: 钙调神经磷酸酶 (CN) 属苏/丝氨酸蛋白磷酸酶, 在软体动物的抗菌应答、免疫调节中发挥重要作用。本研究利用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆获得三角帆蚌 CN 基因 α 型催化亚基 (*HcCnAα*) 的 cDNA 序列, 并进行了生物信息学分析。构建 *pET30a-HcCnAα* 原核表达载体, 将诱导表达、纯化、复性后蛋白免疫小鼠制备多克隆抗体。用蛋白质印迹法 (Western blot, WB) 和荧光定量 PCR (qPCR) 技术分析健康状态和感染维氏气单胞菌 GL2 后 *HcCnAα* 在三角帆蚌不同组织中的表达情况。结果显示, *HcCnAα* cDNA 全长 2 737 bp, 其中 3' UTR 长 131 bp, 5' UTR 长 1 154 bp, CDS 区为 1 452 bp, 编码 483 个氨基酸, 序列包含蛋白磷酸酶保守的 PP2Ac 结构域。WB 和 qPCR 结果显示, *HcCnAα* 在三角帆蚌各组织中广泛存在, 并在闭壳肌、斧足、性腺、鳃中的表达量较高, 在血液中的表达量最低。维氏气单胞菌 GL2 感染三角帆蚌后 3~24 h, 鳃中 *HcCnAα* 的表达量显著升高, 6 h 时闭壳肌中表达量也显著升高, 感染后 24 h, 肝胰腺、斧足、血液、外套膜中的表达量显著升高。而感染后 48 h, 闭壳肌、鳃、外套膜、肝胰腺中的表达量显著降低。研究表明, 三角帆蚌 *HcCnAα* 基因与其他物种 *CnAα* 基因高度相似, 具有保守的 PP2Ac 结构域, 在各组织中普遍表达, 并参与了三角帆蚌在细菌感染后的免疫反应。本研究首次克隆了三角帆蚌 *HcCnAα* 基因并制备了多克隆抗体, 揭示了 *HcCnAα* 基因参与三角帆蚌的抗感染免疫应答, 为深入研究三角帆蚌的免疫调控机制和疾病防控策略奠定了基础。

关键词: 三角帆蚌; 维氏气单胞菌; 钙调神经磷酸酶; 多克隆抗体; 细菌感染

中图分类号: Q 786; S 944.1⁺21

文献标志码: A

神经钙调磷酸酶 (calcineurin, CN) 是迄今发现的唯一受 Ca^{2+} 和钙调素 (calmodulin, CaM) 调节的丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶, 由催化亚基 (CnA) 和调节亚基 (CnB) 组成二聚体形式。当 CN 被激活后可调节生物大分子的磷酸化或去磷酸化^[1-2], 介导 NFAT、NF- κ B、MARK、GATA4、ATOX8 等多条信号通路, 参与机体生长发育、疾病发生、

细胞功能等多种生理反应^[3-6]。特别是 CN 可以通过去磷酸化激活 NFAT 和 NF- κ B 信号通路调节白介素 2 (IL-2)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和干扰素 γ (IFN- γ) 等免疫相关基因的表达, 参与机体的免疫反应^[7-10]。

在脊椎动物中, CN 在免疫、神经、心血管系统中的作用比较清楚, 并在细胞增殖、细胞凋

收稿日期: 2024-02-24 修回日期: 2024-04-05

资助项目: 重庆市自然科学基金 (CSTC2021JCYJ-MSXMX1202); 重庆市生态渔业产业技术体系 (CQMAITS202315); 重庆市水产科技重点攻关项目 (CQFTIU2024-09); 重庆市技术创新与应用发展专项 (CSTB2022TIAD-ZXX0053)

第一作者: 龙凯 (照片), 从事水产微生物与免疫研究, E-mail: 1449096602@qq.com

通信作者: 吴正理, 从事水产微生物与免疫研究, E-mail: zh20140202@swu.edu.cn



亡、肌肉发育和肌纤维再生等方面发挥重要调控作用^[4, 11-13]。脊椎动物的免疫过程中, 可通过调节 CN 表达水平进而调控下游免疫相关因子的表达以参与免疫反应^[14], 因此, 探究 CN 在免疫调节中的作用, 从而通过调节 CN 来治疗疾病是当前的研究热点, 特别是在癌症、器官移植、阿尔茨海默病等的治疗上^[15-18]。在无脊椎动物中, CN 也可能在免疫反应、种系发育、产卵生殖、肌肉形成和神经系统功能等方面发挥重要作用^[6, 19-21]。有研究表明, CN 在贝类的壳和珍珠的形成、性别分化等方面发挥重要作用^[22-23], 此外其在宿主受到免疫刺激后也会通过激活 NF- κ B 信号通路或其他方式调节免疫基因的表达, 发挥免疫作用^[10, 14]。可见从脊椎动物到无脊椎动物、软体动物, CN 都在机体的免疫应答中起着重要作用, 也是开展贝类先天性免疫研究的一个重要方向。然而, CN 在无脊椎动物中的作用机制还不明确, 尤其是在软体动物中还缺乏深入研究。

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 是我国重要的淡水养殖贝类, 因其优质的育珠性能和滤食性能, 具有不可替代的经济价值和生态价值^[24-25]。但在现代高密度、集约化的养殖模式下, 各种制约三角帆蚌养殖的因素日趋严重, 严重影响宿主先天免疫水平, 导致发病率不断上升^[26-27]。其中细菌引起的水产疾病最为突出, 水体中常见的维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*)、嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*)、嗜麦芽窄食单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 和荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 等会感染三角帆蚌, 引发疾病, 甚至造成死亡^[28-30], 极大阻碍了三角帆蚌的养殖产业发展。因此, 开展三角帆蚌先天性免疫研究将有助于丰富其免疫学基础知识, 为养殖中的疾病防控提供新的策略, 推动养殖业绿色健康发展。本实验克隆了三角帆蚌 *HcCnAa* 基因, 并利用病原菌维氏气单胞菌感染三角帆蚌, 揭示了 *HcCnAa* 参与三角帆蚌的抗感染免疫应答, 以期为贝类养殖中的疾病防控提供新的策略, 推动贝类养殖的发展。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用的三角帆蚌湿重 [(42.59±1.75) g, 1 龄], 来自国家贝类产业技术体系重庆综合试

验站大洪湖核心示范基地, 小鼠 (*Mus musculus*) 购自重庆恩斯维尔生物科技有限公司, 维氏气单胞菌 GL2 来自本实验室从患病三角帆蚌鳃上分离保存。实验开始前, 将三角帆蚌暂养, 控制水温在 (23.0±2.0) °C, 24 h 充氧, 每天更换曝气水并用小球藻 (1×10⁵ 个/mL) 进行投喂。实验期间对小鼠正常投喂饲料和水, 每天更换垫料, 保持饲养温度为 (23.0±1.0) °C。实验过程中操作人员严格遵守实验动物饲养管理使用指南和伦理规范。

1.2 实验方法

HcCnAa 基因的克隆 从实验室已有的转录组库中^[31] 筛选出三角帆蚌 *HcCnAa* 基因保守片段, 用 Primer premier 5.0 软件设计引物 (表 1), 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。参照雷丽娜等^[32] 的方法, 按照 RNAiso Plus (TaKaRa, 日本) 试剂盒说明进行三角帆蚌外套膜 RNA 的提取, 并将提取 RNA 按照 SMARTer RACE 5'/3' Kit (TaKaRa, 日本) 试剂盒说明, 进行 cDNA 的合成和目的基因的扩增, 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后纯化回收, 并与 pMD19-T (TaKaRa, 日本) 连接, 转化入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞 (TaKaRa, 日本) 中, 过夜培养后挑取

表 1 本实验所需引物列表
Tab. 1 Primers used in this study

名称 name	序列 sequence
RACE引物 RACE primers	
<i>HcCnAa</i> -3'-F1	ATAACAGTGTACGAGGTTGCTCA
<i>HcCnAa</i> -5'-R1	GTGACGGGAATCCTGTTGTTT
<i>HcCnAa</i> -5'-F2	AGCTATGCAGCTTGTGTGATTT
<i>HcCnAa</i> -3'-R2	CGGGAATCCTGTTGTTTGACT
原核表达引物 prokaryotic expression primers	
p <i>HcCnAa</i> -F	<u>CCG</u> G <u>AATTCG</u> TCACAGAGGATGTG
p <i>HcCnAa</i> -R	<u>CCGCTCGAG</u> CTATGTCACCTTTTCTCTCTAC
qPCR引物 qPCR primers	
<i>HcCnAa</i> -q-F	AGTGTGCTCCAGCTCAAGGG
<i>HcCnAa</i> -q-R	GTGGCGGCATTCGCTCATT
<i>EF-1α</i> -F	GGAACCTCCCAGGCAGACTGTGC
<i>EF-1α</i> -R	TCAAAACGGGCCGAGAGAAT

注: 下划线部分表示保护碱基, 双下划线部分表示 *Bam*H I 酶切位点, 虚线部分表示 *Eco*R I 酶切位点。
Notes: The underlined parts were the protected bases, the double underlines parts were the restriction sites of *Bam*H I, and the dotted lined parts were the restriction sites of *Eco*R I.

单菌落进行菌液 PCR 验证, 后将阳性克隆送于生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

HcCnAa 基因的序列分析 参照房晓宸等^[33]的方法, 利用 NCBI 对 *HcCnAa* 基因进行 ORF 区预测 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 及核苷酸和氨基酸序列相似性分析 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); 利用 DNAMAN 6.0 软件进行氨基酸序列分析和多序列比对; 利用 SNART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线预测蛋白质结构域; 利用 ExPasy(<http://www.expasy.org/>) 在线分析蛋白质特性; 利用 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白质的跨膜结构域和分子质量; 利用 MEGA 7.0 软件, 采用邻接法 (NJ) 构建 *HcCnAa* 基因的系统进化树。

原核表达及蛋白纯化 参照职韶阳等^[34]的方法, 针对 *HcCnAa* 的 CDS 序列设计上下游引物, 并在上下游引物的 5' 端分别引入 *EcoR* I 和 *Bam*H I (TaKaRa, 日本) 酶切位点 (表 1), 进行 PCR 扩增, 扩增产物经纯化回收、测序验证正确性后, 与载体 pET30-a(+) (TaKaRa, 日本) 使用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 进行双酶切连接, 构建表达载体 pET30a-*HcCnAa*, 后转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 在抗卡那霉素的平板 (50 μ g/mL) 上涂板过夜培养, 挑选单菌落, 将菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序分析, 测序正确的菌液进行保种用于后续诱导表达。将上述菌液扩大培养后提取表达载体 pET30a-*HcCnAa* 并转入大肠杆菌感受态细胞 BL21 (TaKaRa, 日本) 中, 在 50 μ g/mL 的抗卡那霉素平板上涂板过夜培养, 挑选单菌落扩大培养后进行菌液 PCR 验证, 验证正确的单菌落进行保存, 并再次扩大培养至对数生长期 (OD 约为 0.6) 时, 加入终浓度 0.5 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG), 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h, 诱导目的蛋白表达。培养结束后离心收集菌体, 使用变性裂解液重悬菌体, 超声破碎后离心取上清液, 按照碧云天 His 标签蛋白纯化试剂盒 (耐变性剂型) 进行纯化, 后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测蛋白纯化情况。

多克隆抗体的制备及检测 参照职韶阳等^[34]的方法, 将纯化后的蛋白装入处理好的透析袋中, 分别置于 6、4、2、1、0 mol/L 的尿素透析液中 4 $^{\circ}$ C 缓慢搅拌透析, 每个梯度透析 4 h 左右, 将透析完的透析袋放在培养皿中, 用聚乙二醇覆

盖约 30 min 浓缩, 利用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天, 上海) 测定浓缩后的蛋白浓度, 将蛋白调整到 1 μ g/ μ L 后取 100 μ L, 与弗氏佐剂按 1:1 的体积比混合 (初次免疫使用弗氏完全佐剂, 后续加强免疫使用弗氏不完全佐剂), 涡旋 30 min 左右使其充分乳化, 对小鼠进行皮下多点注射。共进行 3 次注射, 间隔时间分别为 7 和 10 d, 第 3 次注射后 7 d 对小鼠眼球取血获得血清, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。利用蛋白质印迹法 (Western blot) 检测抗体特异性: 纯化蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后转膜至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜); 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, T-BST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 制备的多克隆抗体 1:1 000 稀释作为一抗, 4 $^{\circ}$ C 摇晃过夜孵育, T-BST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (碧云天, 中国) 1:1 000 稀释作为二抗, 室温摇晃孵育 1 h, T-BST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 超敏 ECL 化学发光试剂盒 (碧云天, 中国) 显色处理后成像观察。

***HcCnAa* 的 mRNA 水平组织表达** 取三角帆蚌的不同组织, 根据 RNAiso Plus (TaKaRa, 日本) 的操作说明进行 RNA 提取, 根据 Prime-ScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 日本) 操作说明进行 cDNA 的合成。根据 *HcCnAa* 基因的 CDS 区设计荧光定量的引物 (表 1), 以延伸因子-1 α (*EF-1 α*) 为内参, 利用 BIORAD CFX ConnectTM 荧光定量仪检测 *HcCnAa* 基因在三角帆蚌不同组织中的相对表达量。实验中反应体系为 10 μ L SYBR Green Mix (TaKaRa)、0.4 μ L *HcCnAa*-q-F、0.4 μ L *HcCnAa*-q-R、1 μ L cDNA 和 8.2 μ L ddH₂O。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 重复 39 个循环, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算基因的相对表达量。

***HcCnAa* 的蛋白水平组织表达** 参考 Zhou 等^[35]的方法, 取三角帆蚌的不同组织, 根据 RIPA 裂解液 (碧云天, 中国) 操作说明进行蛋白提取, 根据 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天, 中国) 操作说明测定蛋白浓度, 并取 20 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 和后续 Western blot 检测。以肌动蛋白 (β -actin) 为内参, 分别以制备的多克隆抗体和 beta-Actin Mouse mAb (Cell Signaling Technology, 美国) 作为一抗进行 Western blot, 利用 Image J 软件对结果进行灰度分析和归一化处理, 检测 *HcCnAa* 在不同组织中的相对蛋白表达水平。

细菌感染实验 将 50 只健康三角帆蚌 [(42.59±1.75) g] 随机分为 2 组, 将维氏气单胞菌 GL2 培养至对数生长期 (半数致死剂量为 1.98×10^6 CFU/g), 实验组注射 100 μL 80% 半数致死剂量的菌液 (1.58×10^6 CFU/g), 对照组注射等剂量 0.85% 无菌盐水。在注射后的 3、6、12、24、48 h 各随机取 5 只蚌进行取样, 液氮速冻, -80 °C 保存。如上利用荧光定量 PCR 检测目的基因的表达变化。

数据分析 使用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 进行显著性分析, 结果用平均值±标准差 (mean±SE) 表示。P<0.05 为差异显著, P<0.01 为差异极显著。

2 结果

2.1 三角帆蚌 *HcCnAa* 基因的序列分析

本实验利用 RACE 技术克隆得到三角帆蚌钙调神经磷酸酶基因 *HcCnAa* 的 cDNA 序列, 全长为 2 737 bp, 其中 3'UTR 长 131 bp, 5'UTR 长 1 154 bp, CDS 区为 1 452 bp, 编码 483 个氨基酸 (图 1)。SMART 的功能域预测显示, *HcCnAa* 序列包含 PP2Ac 结构域 (图 2-a)。*HcCnAa* 编码的蛋白质理化性质分析可知, 该蛋白质理论分子量 (MW) 为 54.68 ku, 理论等电点 (pI) 为 5.73, 不存在信号肽和跨膜区。在亲水性预测中发现, 在第 365 位氨基酸达到最大亲水性, 其指数为

```

1 AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGGATTCGATGC
42 TTTCTCGCTGGAAAAATCCTTACAAATCGTAGTTAATAGTGCCATCCAAGGCACTAGTAGGTGAATTCATATTTTGTAACTCCAGG
132 ATGGCTACATCGGAGGTAAGCTGTCGACACCGAGAGGCTGTAAAAAGCGTGCTTTCCACCCAGCCATCGACTGACAATGAGTGA
M A T S T E R V K S V A F P P S H R L T M S E
222 GTTTTGTATCCAAAGGAAAACCAAGCCAGAGTTCTGAAGCAACATTTTCTTCTGGAAGGCAGAGTACAGAGGATGTGGCATTACGA
V F D S K G K P K P E V L K Q H F I L E G R V T E D V A L R
312 ATTATCAATGAAGGAGCTGCCCTTTTGGAGCAGAAAGACGATGCTGGACATAGAGGCTCCAGTACAGATGTGGTACATACATGGC
I I N E G A A L L R Q E K T M L D I E A P V T V C G D I H G
402 CAGTTCTACGATCTTATGAAATGTTTGAAGTAGTGCCCAACGACAACCTCGGTACCTTTTTTGGGAGACTATGTGGACCGAGGC
Q F Y D L M K L F E V G G P P A T T R Y L F L G D Y V D R G
492 TATTTTAGTATGAGTGTTTATACCTCTGGCCATGAAAATCTGTATCCAAGTACATTTTTCTGTACGAGGTAACCATGAAATGT
Y F S I E C V L Y L W A L K I L Y P S T F F L L R G N H E C
582 AGGCATCTTACAGAATATTTACCTTTAAACAAGAATGAAAATATAACGGAAAAAGTATATGATGATGATGATGAAAGCTTTTGTAT
R H L T E Y F T F K Q E C K I K Y T E K V Y D A C M E A F D
672 TGCCCTCCCCTTAGCAGCTTTTAAAGAACCAGCAGTTCTGTGTGTACATGGAGGACTGTACCAGAAAATCCACACATTAGATGATATTAG
C L P L A A L M N Q Q F L C V H G G L S P E I H T L D D I R
762 AAGTTGGCGGATCAAGAACCAGCAGTCTGTTCAATGTGTGATTTATATGGTCAGATCCATTAGAAGAATTTGGAAATGAAAA
K L D G F K E P P A F G P M C D L L W S D P L E E F G N E K
852 ACAACAGAACATTTTACACATAACAGTGTACGAGGTGCTCATACTTTTACAGCTATGACGCTGTTGTGATTTCTTGCAACAGAACAA
T T E H F T H N S V R G C S Y F Y S Y A A C C D F L Q Q N N
942 TTATTATCCATTATTAGACACATGAAGCACAAGATGCTGGCTATAGAATGTACAGAAAAAGTCAAACAACAGGATTCCEGTTACATTA
L L S I I R A H E A Q D A G Y R M Y R K S Q T T G F P S L I
1032 ACAATATTCTCAGCACAAAATTTGGATGTATACAATAATAAAGCTGCTATATTGAAATGAAAGATAATGTGATGAATATTAGGCCAA
T I F S A P N Y L D V Y N N K A A I L K Y E D N V M N I R Q
1122 TTCACTGTTCTCCACATCCACTACTGGTTGCCAACTTCATGGATGTTTTCACATGGTCCCCTCCATTGTAGGAGAAAAAGTGACAGAG
F N C S P H P Y W L P N F M D V F T W S L P F V G E K V T E
1212 ATGTTAGTGAATGTATGAAATTTTGTCTCAGATGAGGAATGCTATCCGAAACAGATGACACGTTTGAAGGTGGTGCAGTGACGGCAGA
M L V N V L N I C S D E E L L S E T D D T F E G G A V A A R
1302 AAGGAAGTAAATACGTAACAAGATACGGCCATTTGAAAAATGGCTAGAGTATCTACTGTTTGAGAGAAGAGAGCGAGGTGTGCTCCAG
K E V I R N K I R A I G K M A R V F T V L R E E S E S V L Q
1392 CTTAAAGGCCCTGACACCTAATGGGTTACTCCCATGGGAGCTCTACTGGTGAGGATGATGATGAGCTGCACTCAAACTGCTCTGAGGATTCTCA
L K G L T P N G L L P M G A L S G G R E T L K T A L S G F S
1482 CCAACACATAAAATCAGTGGATTTGAGGAGGCCAAATCTCTGGACAAAATTAATGAGCGAATGCCGCCAGCAAGATGTGCTGAAACAAT
P T H K I S G F E A K S L D K I N E R M P P R K K D V L N N
1572 TCCAGTAGTTAGACCAAGCAGGTATAGCCTTCAAACCATGCTCTGTGCTGTGAGTTCTCCACTGTCATCATATTTGTCCAAGGCA
S S S
1662 GAGGAGCATGATTAGATGTTGACAGTGACACCTTGACAGTTGCCAGATAGACAGAAGCTGGCCATTTACTCCACTACTTCTTCGAT
1752 TCACATCAGAAAAAGACCCCTTAAATATTTCTTTGGTTCTGATAATTCATGCAGTGTACTAAATCTGATCTCAACTTTCTCCATCAA
1842 TTTACCTTGAAGTAAATTAATATTTGCTTTAGCTCATTGATAAATCAAAGTGCAGTTTTAAATCTCATATTAAGCAGTGTGGGAATC
1932 CATTTTAAAGCATATGCCAGCAAGTAAAGCTGCTACATGCAGATGAAAACTACAAAGCTTTCTTTGGCTTCAGTGCATATTTCTTAA
2022 GTAACATAAACAGTTCTAGTCAGATGGATTTTCTACTTTTAAATATTCCTGTAAGCAGCTATGATATGAGCTGCATTTGCTTGGATTG
2112 ATTTCTCTAGAACTGGTCAGCTTCTATTGCAAAATGTTGAACCTGCTATCAAAAATTTGACCATGGGCTTCATGTTGAGCATGGAA
2202 GATGGGATTTCTGTTGAGCTTCAAAAACGGAAGTTGTTGATTCATGTTAAATTTGGAAGATTGAGGGGTGATTGCTGCTTCA
2292 AAAAAAGCCTTTATTTGTTGAGTTGAGGTTACTATTTGTCAGGACTTGCATATTCTATGAAACAGCCAGTAAATGAAAGGAGGATGGGT
2382 TCTAAAGATGATAAATGATTAAACCTTCCATTTTATCTGTTCACAATGAGATTGGAATGTTTATGGACTGCTTATGAAATGTCCCT
2472 TTGGATTTTGTGTTAATTAATTCATGAGTGATTTCTGCAACAACAACAAAATGTTAATCATGTTTATGAGACAGAAATTTATATTTG
2562 TAAATTTGCCAGCTTACCTGATTTCATGAATTTTTCATCTTTTCAAGGTATTGCAAGGCCATTGGAGTTGATGAAAGTATGAATCCATTG
2652 CTCCTACAATACATTAAGAAAGATCAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 *HcCnAa* 基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列

阴影部分代表功能域, 双下划线部分代表丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白磷酸酶活性位点。

Fig. 1 Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of *HcCnAa* gene

The shaded part represents the functional domain and the double underline marks the serine/threonine-specific protein phosphatase active site.

-2.744, 在第 472 位氨基酸达最大疏水性, 指数为 1.989, 总平均亲水性系数 (GRAVY) 为 -1.187, 该蛋白质为亲水性蛋白 (图 2-b)。

2.2 同源性和进化树分析

基于 *HcCnAa* 的氨基酸序列, 将其与长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、欧洲平牡蛎 (*Ostrea edulis*)、欧洲大扇贝 (*Pecten maximus*)、小头虫 (*Capitella capitata*)、红鲍 (*Haliotis rufescens*)、紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*)、中华蛸 (*Octopus sinensis*)、小鼠 (*Mus musculus*)、人 (*Homo sapiens*) 共 9 个物种进行序列比对, *HcCnAa* 与 9 个物种的氨基酸序列有较高的同源性, 特别是 PP2Ac 结构域具有高度保守性 (图 3), 利用邻接法构建的系统发育树结果显示, 三角帆蚌与人、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、小鼠的亲缘关系比较远, 与欧洲大扇贝、紫贻贝的亲缘关系最近 (图 4)。

2.3 原核表达及多克隆抗体的制备

空载质粒 pET30-a(+) 和表达质粒 pET30a-*HcCnAa* 成功转入大肠杆菌 BL21 中后, 扩大培养, 对空载质粒菌液、表达载体的未诱导菌液、表达载体诱导菌液及纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 检测。结果显示, 表达载体的诱导菌液及纯化蛋白均在约 40 ku 处存在一条蛋白条带, 符合目的蛋白大小, 而在空载菌液和表达载体的未诱导菌液中未出现相应条带, 表明成功诱导目的蛋白的表达, 且纯化蛋白不存在杂带, 纯化效果较好 (图 5-a)。提取三角帆蚌肝胰腺组织蛋白, 以多克

隆抗体血清为一抗、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, 应用 Western blot 检测抗体的特异性。结果显示, 在约 50 ku 处存在单一条带, 反应良好, 制备出的多克隆抗体具有良好特异性 (图 5-b)。

2.4 *HcCnAa* 的组织表达分析

对三角帆蚌的肝胰腺、外套膜、闭壳肌、斧足、鳃、血淋巴、肾脏、肠道、性腺共 9 个组织中 *HcCnAa* 的相对表达量进行 mRNA 水平和蛋白水平的检测, 从两个维度综合分析 *HcCnAa* 在三角帆蚌一般组织中的表达情况。荧光定量结果显示, *HcCnAa* 在 9 个组织中均有表达, 并在闭壳肌中的表达量显著高于其他各组织 ($P < 0.05$), 在斧足、鳃、肠道、肾脏、性腺中的表达量也较高, 而在肝胰腺、外套膜、血淋巴中的表达量显著低于其他组织 ($P < 0.05$), 其中血淋巴中的表达量是所有组织中最低的 (图 6-a)。Western blot 结果显示, *HcCnAa* 在肠道中的表达量显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 在闭壳肌和外套膜中的表达量显著高于除肠道外的其他组织 ($P < 0.05$), 在其他组织中的表达量都较低, 其中血液中的表达量显著低于其他组织 ($P < 0.05$) (图 6-b)。

2.5 细菌感染后三角帆蚌 *HcCnAa* 的表达情况

维氏气单胞菌 GL2 感染三角帆蚌后, 三角帆蚌各组织中 *HcCnAa* 的表达出现了不同程度的变化。在血细胞中, 感染后 12 h 内, *HcCnAa* 的表达与对照组之间没有显著差异, 感染后 24 h *HcCnAa* 的表达量上升至最高, 极显著高于对照

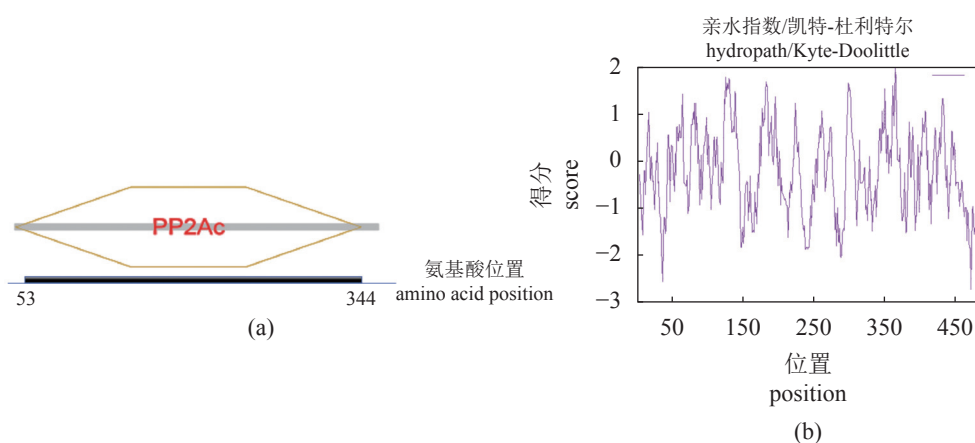


图 2 *HcCnAa* 基因的分子表征

(a) 结构域预测, PP2Ac 结构域 (53~344 aa); (b) 疏水性预测。

Fig. 2 Molecular characterisation of the *HcCnAa* gene

(a) domains prediction, the PP2Ac domains (53~344 aa); (b) hydrophobicity prediction.

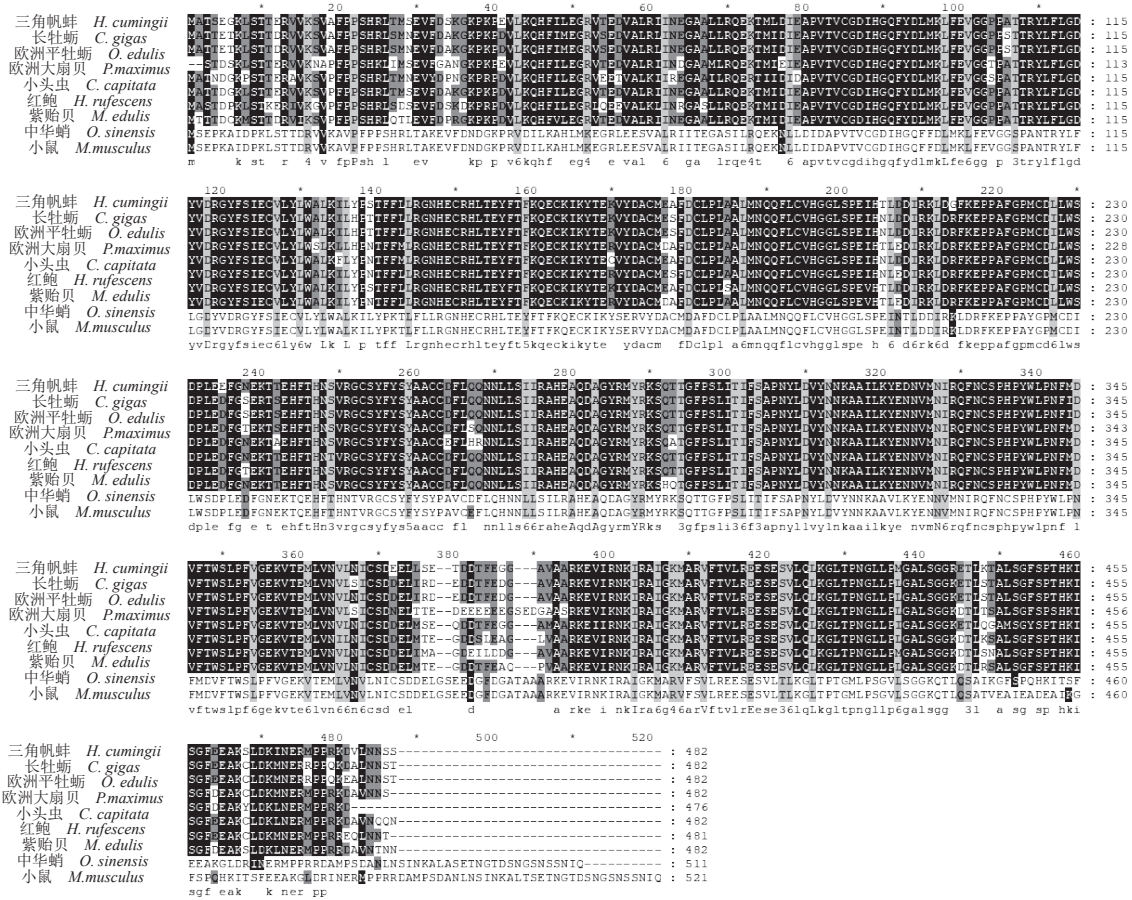


图3 三角帆蚌 *HcCnAa* 与其他物种的氨基酸多序列比对

黑色阴影表示氨基酸相同, 其他阴影表示氨基酸部分相同。

Fig. 3 Multiple sequence alignment of *H. cumingii* *HcCnAa* with other species

Black shading indicates amino acid identity, other shadings indicate partial amino acid identity.

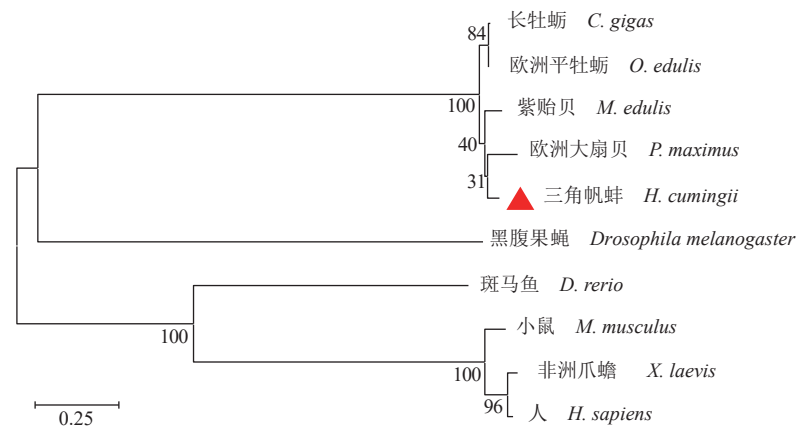


图4 基于 *HcCnAa* 氨基酸序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed based on *HcCnAa* amino acid sequences

组 ($P < 0.01$), 随后在 48 h 下降至与对照组无显著差异 (图 7-a)。斧足中 *HcCnAa* 的表达量在感染后 3~48 h 都与对照组无显著差异 (图 7-b)。闭壳肌

中 *HcCnAa* 的表达量在感染后 6 h 上升至最高, 极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 在 48 h 时下降至显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 7-c)。鳃中 *HcCnAa* 的表

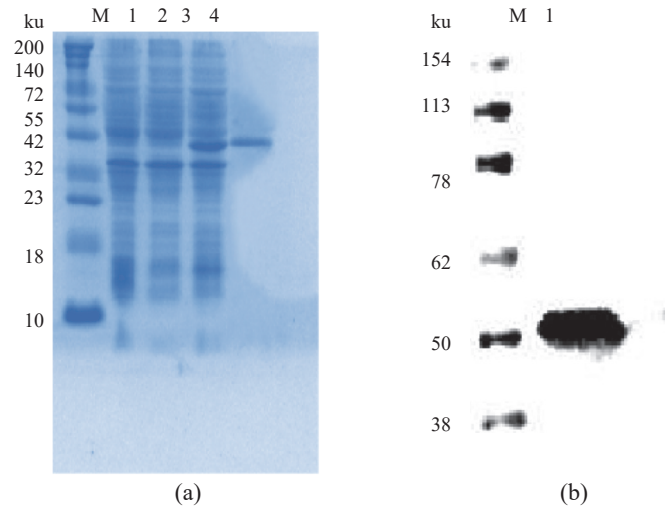


图5 pET30a-*HcCnAα* 的表达纯化及多克隆抗体特异性检测

(a) SDS-PAGE, M. 蛋白分子质量标准, 1. PET30a(+) 诱导菌液, 2. pET30a-*HcCnAα* 未诱导菌液, 3. pET30a-*HcCnAα* 诱导菌液, 4. 纯化蛋白; (b) Western blot, 1. 组织蛋白。

Fig. 5 Expression and purification of pET30a-*HcCnAα* protein and polyclonal antibody specificity detection

(a) SDS-PAGE, M. protein molecular weight marker, 1. PET30a(+) bacterial induced, 2. pET30a-*HcCnAα* bacterial uninduced, 3. pET30a-*HcCnAα* bacterial induced, 4. purified protein. (b) Western Blot, 1. tissue protein.

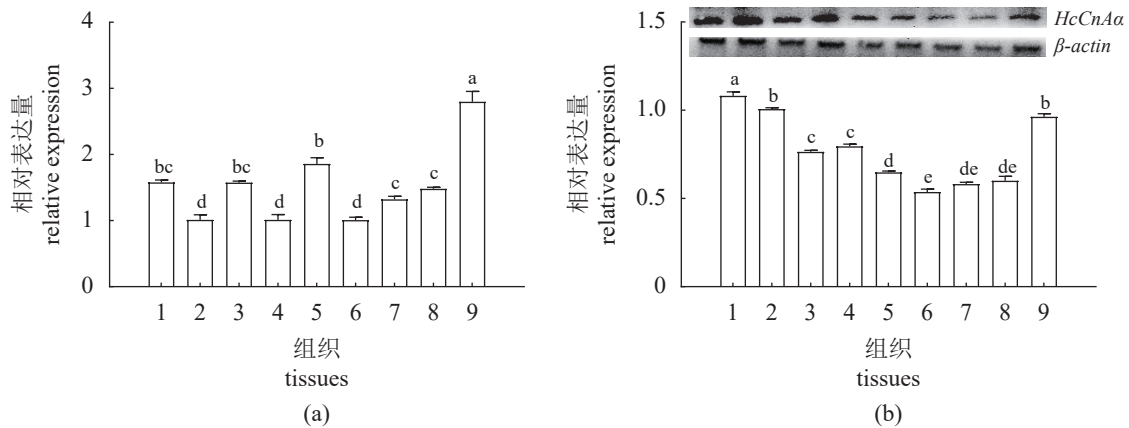


图6 *HcCnAα* 在三角帆蚌不同组织中的相对表达量

(a) mRNA 相对表达量, (b) 蛋白相对表达量。1. 肠道, 2. 外套膜, 3. 斧足, 4. 肝胰腺, 5. 鳃, 6. 血液, 7. 性腺, 8. 肾脏, 9. 闭壳肌; 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 Relative expression of *HcCnAα* in different tissues of *H. cuningii*

(a) relative mRNA expression, (b) relative protein expression. 1. intestines, 2. mantle, 3. foot, 4. hepatopancreas, 5. gill, 6. blood, 7. gonad, 8. kidney, 9. adductor; different letters mean significant differences ($P < 0.05$).

达量在感染后 3 h 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 感染后 6~24 h 极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 后在 48 h 下降至显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 7-d)。外套膜中 *HcCnAα* 的表达量在感染后 24 h 上升至最高, 极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 在 48 h 下降至极显著低于对照组 ($P < 0.01$) (图 7-e)。肝胰腺中 *HcCnAα* 的表达量类似外套膜, 在感染后 24 h 时上升至极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 在 48 h 下降至显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 7-f)。

3 讨论

3.1 *HcCnAα* 的克隆与多克隆抗体的制备

本实验通过 RACE 技术克隆得到三角帆蚌 *HcCnAα* 基因的 cDNA 序列, 并对其氨基酸序列进行了分析, 与其他物种的 *CnAα* 基因一样, 序列包含了蛋白磷酸酶保守的 PP2Ac 催化结构域, 该结构域在蛋白质磷酸化参与各种机体反应中起着核心作用, 且 *HcCnAα* 编码的蛋白质 MW 为

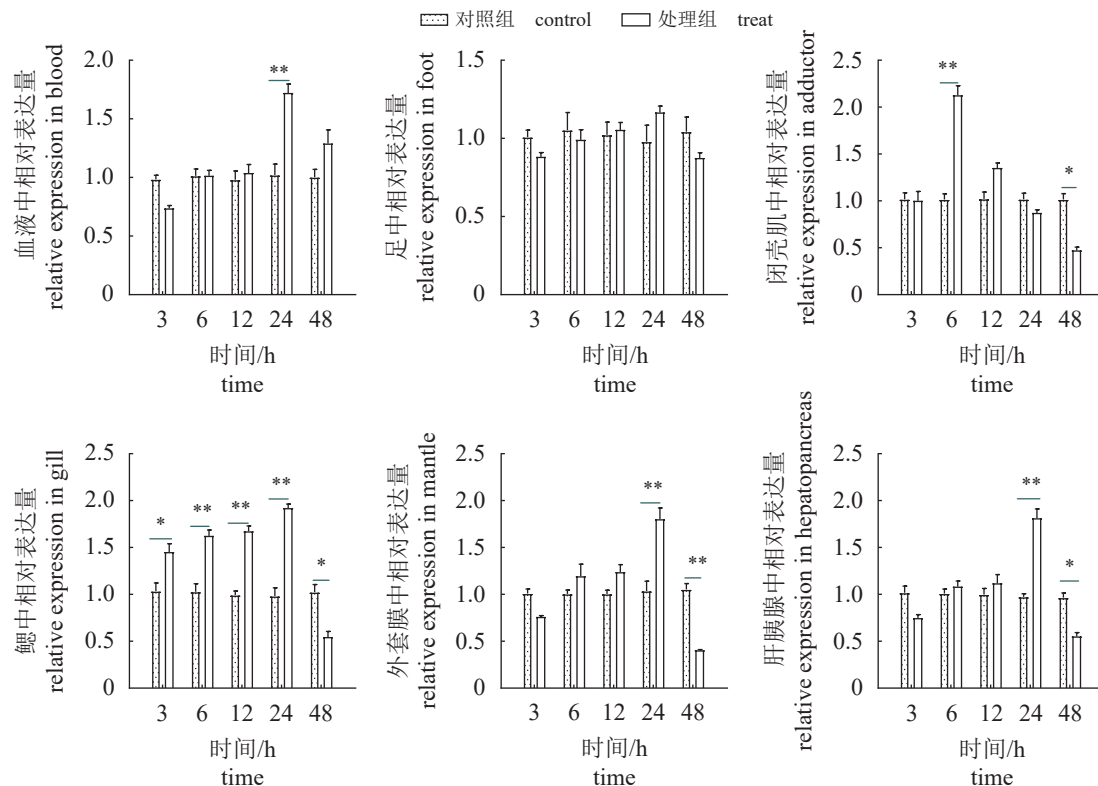


图7 细菌感染后 *HcCnAa* 在三角帆蚌不同组织中的相对表达

(a) 血, (b) 斧足, (c) 闭壳肌, (d) 鳃, (e) 外套膜, (f) 肝胰腺。*表示实验组与对照组的表达量有显著差异 ($P < 0.05$); **表示实验组与对照组的表达量有极显著差异 ($P < 0.01$)。

Fig. 7 Relative expression of *HcCnAa* in different tissues of *H. cumingii* after bacterial infection

(a) blood, (b) foot, (c) adductor, (d) gill, (e) mantle, (f) hepatopancreas. * means infection group expression level compared with control group has significant differences ($P < 0.05$); ** means infection group expression level compared with control group has extremely significant differences ($P < 0.01$).

54.68 ku, 而长牡蛎和杂色鲍 (*H. diversicolor*) 中 *CnA* 编码蛋白的 MW 分别为 56.4 ku 和 58.51 ku, *HcCnAa* 编码的蛋白大小与其他贝类相近^[22-23]。此外, *HcCnAa* 的亲水性、等电点等理化性质也都与其他贝类中情况相似, 且通过构建系统发育树分析进化关系, *HcCnAa* 与贝类的亲缘关系最近, 这说明本实验克隆得到的三角帆蚌 *HcCnAa* 基因序列正确可信。之后进行原核表达成功诱导目的蛋白, 并利用纯化的蛋白制备了多克隆抗体, 该抗体具有良好的特异性, 与纯化蛋白和从三角帆蚌中提取的组织蛋白均能良好结合, 为 *HcCnAa* 的后续研究打下了良好基础。

3.2 *HcCnAa* 的组织表达分析

本实验从 mRNA 水平和蛋白水平检测了 *HcCnAa* 在组织中的表达情况。检测结果显示, *HcCnAa* 在组织中 mRNA 水平和蛋白水平上的表达存在一定差异, 如肠道在 mRNA 水平的表达量在所有组织中处于中间水平, 但在蛋白水平的表

达量则是所有组织中最高的。这种基因在 mRNA 水平和蛋白水平上的表达差异是生物学研究中的正常现象, 在以往研究中广泛存在^[36]。因为基因表达的转录和翻译存在时空间隔, 二者发生的时间和空间不一致, 且伴随着后续的加工过程^[37]。

综合两个水平的表达情况分析, *HcCnAa* 在血细胞中的表达量是所有组织中最底的, 而在闭壳肌、性腺、斧足等组织中的表达量比较高, 这可能与其复杂的生理调控作用有关。在海湾扇贝 (*Argopecten purpuratus*) 中, *CnA* 在性腺中的表达量显著高于其他组织, 并证实 *CnA* 在海湾扇贝的性别分化中起着重要作用^[38]。在杂色鲍中, *CnA* 在血细胞中的表达量最低, 在斧足、肝胰腺中的表达量显著高于其他组织, 这与本实验的研究结果有一定程度的吻合^[14]。而在马氏珠母贝 (*Pinctada fucata*) 中, *CnA* 在血细胞中的表达量显著高于其他组织, 在外套膜、性腺、闭壳肌、鳃、斧足等组织中无显著差异^[10]。综上所述, *CnA* 虽然在绝大多数动物组织中广泛存在, 但在不同的物种中

作用模式可能存在差异, 具有深入研究的必要性。

3.3 细菌感染后 *HcCnA α* 的表达情况

在维氏气单胞菌感染后, 三角帆蚌外套膜、鳃、肝胰腺、血细胞、闭壳肌中 *HcCnA α* 的表达量变化显著, 说明 *HcCnA α* 在三角帆蚌的抗菌免疫反应中可能主要在外套膜、鳃、肝胰腺、血细胞中发挥作用。感染后 3 h, 鳃中 *HcCnA α* 的表达量显著高于对照组, 这说明 *HcCnA α* 可能参与了细菌感染后免疫反应的早期阶段。但在其他贝类中, 细菌感染后宿主斧足中 *CnA* 的表达量也存在显著上升的情况, 如杂色鲍被细菌感染后, 斧足中 *CnA* 的表达量显著高于对照组^[14]。这揭示了贝类的抗菌免疫应答是一个多组织参与的复杂反应, *CnA* 除了在外套膜、鳃、肝胰腺、血液等常规的免疫相关组织中参与抗菌反应外, 也会在斧足和闭壳肌中发挥作用^[39-40], 但具体的作用机制目前尚不清楚, 需进一步研究。

本研究成功克隆了三角帆蚌 *HcCnA α* 基因, 制备了特异性的多克隆抗体, 从蛋白水平和 mRNA 水平分析了 *HcCnA α* 在一般组织中的表达情况, 为后续 *HcCnA α* 在三角帆蚌中的功能研究奠定了良好的基础, 并检测 *HcCnA α* 在宿主细菌感染后的表达变化, 揭示了 *HcCnA α* 参与三角帆蚌的抗感染免疫应答, 为深入研究三角帆蚌的免疫调控机制和疾病防控策略奠定了基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Li H M, Rao A, Hogan P G. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins[J]. *Trends in Cell Biology*, 2011, 21(2): 91-103.
- [2] Zhang N, Liu Y Y, Shi X Y, *et al.* Microscale thermophoresis and fluorescence polarization assays of calcineurin-peptide interactions[J]. *Analytical Biochemistry*, 2022, 646: 114626.
- [3] Morimoto T, Hasegawa K, Wada H, *et al.* Calcineurin-GATA4 pathway is involved in β -adrenergic agonist-responsive endothelin-1 transcription in cardiac myocytes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(37): 34983-34989.
- [4] Chen J C, Balakrishnan-Renuka A, Hagemann N, *et al.* A novel interaction between ATOH8 and PPP3CB[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2016, 145(1): 5-16.
- [5] Lynn F C, Sanchez L, Gomis R, *et al.* Identification of the bHLH factor Math6 as a novel component of the embryonic pancreas transcriptional network[J]. *PLoS One*, 2008, 3(6): e2430.
- [6] Edmister S T, Ibrahim R, Kakodkar R, *et al.* A zebrafish model for calcineurin-dependent brain function[J]. *Behavioural Brain Research*, 2022, 416: 113544.
- [7] 孙雅萌. CaN/NFAT 信号通路在川崎病免疫性冠状动脉损伤中的作用机制 [D]. 舟山: 浙江大学, 2019. Sun Y M. The role of CaN/NFTA pathway in Kawasaki disease-induced immune coronary artery lesions[D]. Zhoushan: Zhejiang University, 2019 (in Chinese).
- [8] Wang L, Cheng N, Wang P, *et al.* A novel peptide exerts potent immunosuppression by blocking the two-site interaction of NFAT with calcineurin[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(9): 2760-2770.
- [9] Miyatake S, Kaminuma O. Inhibitors of NFAT-calcineurin pathway[J]. *Nihon Rinsho Japanese Journal of Clinical Medicine*, 2005, 63(9): 1633-1639.
- [10] Li C Z, Liang J, Ma Z J, *et al.* Calcineurin mediates the immune response of hemocytes through NF- κ B signaling pathway in pearl oyster (*Pinctada fucata*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(2): 253-260.
- [11] Andersen Ø, Torgersen J S, Pagander H H, *et al.* Gene expression analyses of essential catch factors in the smooth and striated adductor muscles of larval, juvenile and adult great scallop (*Pecten maximus*)[J]. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 2009, 30(5-6): 233-242.
- [12] Chen L, Song M, Yao C Y. Calcineurin in development and disease[J]. *Genes & Diseases*, 2022, 9(4): 915-927.
- [13] Masaki T, Shimada M. Decoding the phosphatase code: regulation of cell proliferation by Calcineurin[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1122.
- [14] Buddawong T, Asuvapongpatana S, Senapin S, *et al.* Characterization of calcineurin A and B genes in the abalone, *Haliotis diversicolor*, and their immune response role during bacterial infection[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e8868.
- [15] Medyouf H, Ghysdael J. The calcineurin/NFAT signaling pathway: a NOVEL therapeutic target in leukemia and solid tumors[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(3): 297-303.
- [16] Mukherjee S, Botha J F, Mukherjee U. Immunosuppression in liver transplantation[J]. *Current Drug Targets*,

- 2009, 10(6): 557-574.
- [17] Asai M, Kinjo A, Kimura S, *et al.* Perturbed calcineurin-NFAT signaling is associated with the development of Alzheimer's disease[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2016, 39(10): 1646-1652.
- [18] Lao M Y, Zhang X Z, Yang H S, *et al.* RCAN1-mediated calcineurin inhibition as a target for cancer therapy[J]. *Molecular Medicine*, 2022, 28(1): 69.
- [19] Gajewski K, Wang J B, Molkentin J D, *et al.* Requirement of the calcineurin subunit gene *canB2* for indirect flight muscle formation in *Drosophila*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(3): 1040-1045.
- [20] Huang Y, Wang W F, Huang C X, *et al.* miR-731 modulates the zebrafish heart morphogenesis *via* targeting Calcineurin/Nfatc3a pathway[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2022, 1866(6): 130133.
- [21] Li S, Jia Z R, Chen X L, *et al.* Identification and characterization of the cDNAs encoding the two subunits of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) calcineurin: their implications in stress and immune response[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(1): 91-102.
- [22] Li C Z, Hu Y L, Liang J, *et al.* Calcineurin plays an important role in the shell formation of pearl oyster (*Pinctada fucata*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2010, 12(1): 100-110.
- [23] Buddawong T, Asuvapongpatana S, Suwannasing C, *et al.* Calcineurin subunit B is involved in shell regeneration in *Haliotis diversicolor*[J]. *PeerJ*, 2021, 9: e10662.
- [24] Chen Q, Jiang X M, Han Q X, *et al.* Growth, calcium content, proximate composition, and fatty acid composition of triangle sail mussel (*Hyriopsis cumingii*) fed five different microalgal diets[J]. *Aquaculture*, 2021, 530: 735719.
- [25] Yu X B, Zhao Z, Tang R, *et al.* Assessment of the environmental purification of triangle sail mussel (*Hyriopsis cumingii*) in recirculating aquaculture systems[J]. *Applied Ecology and Environmental Research*, 2020, 18(2): 3439-3454.
- [26] Hu M H, Wu F L, Yuan M Z, *et al.* Combined effects of toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and hypoxia on the physiological responses of triangle sail mussel *Hyriopsis cumingii*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 306: 24-33.
- [27] Zhao Q Q, Feng K, Zhang L B, *et al.* Effects of acute ammonia stress on antioxidant responses, histopathology and ammonia detoxification metabolism in triangle sail mussels (*Hyriopsis cumingii*)[J]. *Water*, 2021, 13(4): 425.
- [28] 杨清麟. 三角帆蚌高致病力菌株的分离鉴定及其对宿主免疫应答的影响 [D]. 重庆: 西南大学, 2021.
- Yang Q L. Isolation and identification of highly virulent strains of *Hyriopsis cumingii* and their effects on host immune response[D]. Chongqing: Southwest University, 2021 (in Chinese).
- [29] Yang Q L, Guo K F, Zhou X C, *et al.* Histopathology, antioxidant responses, transcriptome and gene expression analysis in triangle sail mussel *Hyriopsis cumingii* after bacterial infection[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 124: 104175.
- [30] Yang Q L, Yu X B, Du C Y, *et al.* Bacterial challenge undermines the innate immune response in *Hyriopsis cumingii*[J]. *Aquaculture*, 2021, 530: 735783.
- [31] 郭可凡. 维氏气单胞菌 *ascR* 基因缺失株的构建及其诱导三角帆蚌免疫应答的研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2023.
- Guo K F. Construction of *ascR* gene mutant in *Aeromonas veronii* and its induction of immune responses in *Hyriopsis cumingii*[D]. Chongqing: Southwest University, 2023 (in Chinese).
- [32] 雷丽娜, 高谦, 王伟, 等. 花鲈 IgM 重链和 MHC II β 基因的克隆及表达分析 [J/OL]. 水产学报, 2023: 1-19. [2024-04-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1283.S.20231121.1438.006.html>.
- Lei L N, Gao Q, Wang W, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of IgM and MHC II β gene in the spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*)[J/OL]. *Journal of Fisheries of China*, 2023: 1-19. [2024-04-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1283.S.20231121.1438.006.html> (in Chinese).
- [33] 房晓宸, 卢金昭, 梁海鹰, 等. 马氏珠母贝 *Bcl-2-like* 基因克隆及其功能初探 [J]. 水产学报, 2021, 45(5): 661-671.
- Fang X C, Lu J Z, Liang H Y, *et al.* Cloning and preliminary study on the function of *Bcl-2-like* gene in *Pinctada fucata martensii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(5): 661-671 (in Chinese).

- [34] 职韶阳, 杨丽萍, 秦超彬, 等. 鲤 irisin 多克隆抗体的制备及应用 [J]. 水产学报, 2023, 47(12): 1-16.
Zhi S Y, Yang L P, Qin C B, *et al.* Preparation and application of polyclonal antibody of irisin of *Cyprinus carpio*[J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(12): 1-16 (in Chinese).
- [35] Zhou H, Ning Y S, Jian Y F, *et al.* Functional analysis of a down-regulated transcription factor-SoxNeuroA gene involved in the acaricidal mechanism of scopoletin against spider mites[J]. *Pest Management Science*, 2024, 80(3): 1593-1606.
- [36] 何苗. 基于 CRISPR-dCas9/Cas13a 的转录及转录后调控体系构建与应用 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2022.
He M. The construction of CRISPR-dCas9/Cas13a-based systems for transcriptional and post-transcriptional regulation and its application[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2022 (in Chinese).
- [37] Boutet I, Moraga D, Marinovic L, *et al.* Characterization of reproduction-specific genes in a marine bivalve mollusc: influence of maturation stage and sex on mRNA expression[J]. *Gene*, 2008, 407(1-2): 130-138.
- [38] Gollogly L K, Ryeom S W, Yoon S S. Down syndrome candidate region 1-like 1 (DSCR1-L1) mimics the inhibitory effects of DSCR1 on calcineurin signaling in endothelial cells and inhibits angiogenesis[J]. *Journal of Surgical Research*, 2007, 142(1): 129-136.
- [39] Zheng L L, Liu H, Wang P, *et al.* Regulator of Calcineurin 1 gene transcription is regulated by nuclear factor-kappaB[J]. *Current Alzheimer Research*, 2014, 11(2): 156-164.
- [40] Pan F, Sun L, Kardian D B, *et al.* Feedback inhibition of calcineurin and Ras by a dual inhibitory protein Carabin[J]. *Nature*, 2007, 445(7126): 433-436.

The *HcCnAa* gene cloning in *Hyriopsis cumingii* and expression after infection with *Aeromonas veronii*

LONG Kai¹, SUN Yu¹, LI Yanhong¹, TENG Shujun², WU Zhengli^{1*}

(1. Conservation and Research Centre for Aquatic Biodiversity in the Upper Reaches of Yangtze River, College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Agricultural Science and Technology Promotion Center of Tongnan District, Chongqing 402660, China)

Abstract: Calcineurin (CN) is a threonine/serine protein phosphatase that plays an important role in the antimicrobial response and immune response in molluscs. In order to investigate the role of CN in the antimicrobial immune response of *Hyriopsis cumingii*, the α -type catalytic subunit of *H. cumingii* CN gene (*HcCnAa*) was cloned by rapid-amplification of cDNA ends (RACE) and its characteristics were analyzed by bioinformatics methods. With the pET30a-*HcCnAa* expression vector successfully constructed and the mice immunized after protein purification and ultrafiltration, polyclonal antibody with good specificity was obtained. The relative expression of *HcCnAa* in different tissues were analyzed by Western blot (WB) and quantitative real-time PCR (qPCR) in a fit state or infected by *Aeromonas veronii* GL2. The results showed that the full length of *HcCnAa* cDNA was 2 737 bp, including 131 bp of 3' UTR, 1 154 bp of 5' UTR, and it encoded a total of 483 amino acids. The sequence contained PP2Ac domains, which are conserved domains of protein phosphatase. WB and qPCR results showed *HcCnAa* was expressed in all the tissues of *H. cumingii*. The expression of *HcCnAa* was highest in adductor, higher in foot, gill, intestines, kidney, and gonad, and the lowest in blood. After infection with *A. veronii* GL2, the expression of *HcCnAa* was significantly up-regulated in gills at 3 to 24 h, and also in adductor at 6 h, in hepatopancreas, foot, blood, and mantle at 24 h, but the expression significantly decreased in adductor, gill, mantle, and hepatopancreas at 48 h. This study suggested that the *HcCnAa* gene of *H. cumingii* was highly similar to the *CnAa* of other species with conserved PP2Ac domains; it was expressed in all tissues, and played a role in immune responses after the bacterial infection. This study successfully accomplished the cloning of *HcCnAa* genes for the first time and the polyclonal antibody was obtained, supporting the involvement of *HcCnAa* in the immune response after the bacterial infection in *H. cumingii*, and thus established a solid groundwork for future investigations in immune regulation, disease prevention and control strategies for *H. cumingii*.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; *Aeromonas veronii*; calcineurin; polyclonal antibody; bacterial infection

Corresponding author: WU Zhengli. E-mail: zh20140202@swu.edu.cn

Funding projects: Chongqing Natural Science Foundation (CSTC2021JCYJ-MSXMX1202); Chongqing Ecological Fisheries Industry Technology System (CQMAITS202315); Chongqing Key Projects in Aquatic Science and Technology (CQFTIU2024-09); Chongqing Special Project for Technological Innovation and Application Development (CSTB2022TIAD-ZXX0053)