

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.17027

黑鲷♀×真鲷♂反交子代与黑鲷的 *CaM* 基因克隆与 mRNA 表达分析

陈淑吟¹, 李鹏², 张志勇¹, 许津¹, 祝斐¹, 贾超峰¹, 王思婷², 任忠宏¹

1. 江苏省海洋水产研究所, 江苏省海水鱼类遗传育种重点实验室, 江苏 南通 226007;

2. 南京师范大学 生命科学学院 生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023

摘要: 为分析黑鲷♀×真鲷♂ (*Acanthopagrus schlegelii* ♀×*Pagrosomus major* ♂)反交子代在生长、发育等经济性状优于黑鲷亲本(*A. schlegelii*)的分子遗传差异, 本研究克隆了反交子代(PA)与黑鲷(As)的 *CaM* 基因, 运用生物信息学方法对基因 *PACaM* 与 *AsCaM* 的序列进行了详细分析; 同时通过荧光定量分析了 *PACaM* 与 *AsCaM* 在仔鱼及 2 龄成鱼不同组织的表达特征。研究结果表明, *PACaM* 基因 cDNA 全长 1180 bp, *AsCaM* 基因 cDNA 全长 1241 bp, 均具有一个 450 bp 的开放阅读框, 编码 149 个氨基酸, 分子量约 16.84 kD, 等电点为 4.09; 序列比对、结构比较等分析表明, *PACaM* 和 *AsCaM* 属 *CaM* 基因家族, 具有 4 个 EF-hand 钙结合功能域。定量分析表明 *CaM* 在两种鱼的仔鱼及成鱼的脑与性腺中有较高表达; *PACaM* 和 *AsCaM* 在仔鱼及成鱼的鳃、肌肉及性腺中的表达存在显著差异($P<0.05$), 在脑、肝及肾中的表达没有明显差异($P>0.05$); *PACaM* 在仔鱼中表达量最高, *AsCaM* 在成鱼性腺中表达最高, 均显示了 *CaM* 基因在生长与繁殖中的重要作用。研究结果为鲷科属间杂交获得的子代与亲本性状的差异的功能基因表达提供一些基础资料。

关键词: 黑鲷; 黑鲷×真鲷杂交; *CaM* 基因; 分子克隆; mRNA 表达

中图分类号: Q96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)06-1193-10

钙调蛋白(calmodulin, CaM)是已知细胞内最重要的 Ca^{2+} 结合蛋白^[1]。CaM 与 Ca^{2+} 结合后参与多种酶和众多细胞过程的调节, 是钙信息转导系统中的主要组成部分^[2-5]。CaM 与不同的钙调素结合蛋白相互作用, 产生不同的生理效应, 发挥其多样性功能^[6]。*CaM* 基因在组织细胞中的分布与含量变化, 与细胞类型、细胞周期及细胞功能直接相关^[7]。对 *CaM* 的表达差异分析表明, 在梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)蜕皮时期, 该基因显示出了明显的调控作用^[8]; 在栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[9]、合浦珠母贝(*Pincta dafucata*)^[10]及长牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[11]的研究, 发现该基因与这些贝类外壳形成密切相关。此外, 研究长牡蛎的 *CaM* 时, 发现位于 ORF 内第 158 位 T-G 的 SNPs 位点突变, 对壳重有显著性影响($P<0.05$)^[12]。在赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)由雌转雄的性逆转

时期, 性腺中 *CaM* 的表达量呈逐渐升高趋势^[13]。这些报道反映了 *CaM* 在物种生长、生殖等活动中的调节功能与密切关系。

黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)属鲷科(Sparidae)棘鲷属, 俗称黑加吉, 是中国南北沿海均可养殖的名贵鱼类^[14], 但其生长速度较慢、养殖周期较长。以黑鲷为母本与鲷科中另一名贵种真鲷(*Pagrosomus major*)杂交获得的反交子代(*P. major* ♂×*A. schlegelii* ♀, PA)在生长速度及抗逆性等方面表现出优于亲本的优势^[15-16]。为探讨反交子代与黑鲷母本在生长或性腺发育等相关性状的基因差异表达与调控, 本研究分别克隆了黑鲷与真鲷反交子代(PA)和黑鲷自交子代(As)的 *CaM* 基因(分别命名为 *PACaM* 和 *AsCaM*), 并通过荧光定量 PCR 技术检测 *PACaM* 与 *AsCaM* 在仔鱼期与成鱼不同组织中 mRNA 表达差异情况, 从分子水平

收稿日期: 2017-01-08; 修订日期: 2017-03-03.

基金项目: 江苏省海洋与渔业局水产三新工程重大项目(D2015-17); 南通市科技局应用基础研究项目(MS12015071, MS12015070).

作者简介: 陈淑吟(1966-), 女, 博士, 研究员, 研究方向为鱼类种质资源与遗传育种. E-mail: shuyinchen89@163.com;

李鹏(1979-), 并列第一作者, 男, 博士, 副教授, 研究方向为动物比较基因组与分子进化. E-mail: biolipeng@163.com

上研究杂交后代与亲本之间在生长发育等性状上的变化。有关鲷科鱼类的 *CaM* 基因相关研究目前还很少见; 针对不同属鱼类的杂交子代与亲本进行该基因表达的比较研究更少, 本研究将为基因水平的遗传育种提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 样本准备

实验鱼均取自江苏省海水增殖技术及种苗中心。幼龄鱼样本分别取自室内培育的 30 日龄仔鱼; 成鱼样本取自混合养殖于同一口池塘并随机抽选的 2 龄健康个体。每种鱼各取 5 尾, 体长、体质量数据见表 1。

取仔鱼整体和成鱼的脑、肌肉、鳃、肝、肾、性腺等组织分别放入置有 *RNAlater* RNA Stabilization Reagent (QIAGEN) 的 1.5 mL 离心管内, 用灭菌小号剪刀剪成小碎粒(粒径小于 0.2 mm), 置于 4℃ 过夜, 然后转-20℃ 保存备用。

用 RNeasy Mini Kit (QIAGEN) 分别提取 PA 与 As 的仔鱼整体和成鱼各组织样本的总 RNA。通过分光光度计(Eppendorf)和琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的浓度和纯度。使用 PrimerScript™ RT reagent Kit with gDNA EraserRR047A 试剂盒 (TaKaRa) 进行反转录 PCR 获得 cDNA 模板。

1.2 *PACaM* 与 *AsCaM* 基因 cDNA 全长序列克隆

采用已知的其他鱼类 *CaM* 基因的保守序列设计、合成 *CaM* 简并引物 *CaMF*/*CaMR* (表 2), 以 cDNA 第一链为模板进行基因中间片段的扩增。PCR 反应体系(50 μL)包括: 25 μL 2×*Ex-Taq* Buffer (TaKaRa), 1 μL dNTP Mix (10 mmol/L), 15 μL 无菌水, 1 μL *Taq* DNA 聚合酶(5 u/μL), 3 μL 基因简并引物(10 μmol/L)和 5 μL cDNA, 最后用 50~100 μL 矿物油覆盖。PCR 反应条件如下: 94℃

4 min 预变性; 然后 94℃ 0.5 min, 55℃ 0.5 min, 72℃ 2 min, 30~35 个循环; 72℃ 扩展 10 min, 5℃ 孵育至下样。PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶分离检测, 用凝胶纯化试剂盒(Ayxygen)纯化。纯化的 PCR 产物克隆入 pMD® 18-T 载体(TaKaRa), 转化进入大肠杆菌感受态细胞 DH5α(TaKaRa), 经 PCR 验证后取 3 个阳性克隆进行测序。

根据克隆获得的 *CaM* 基因中间片段序列 (*AsCaM* 基因序列的 GenBank 登录号 FM145609.1), 设计并合成 5'-RACE 和 3'-RACE 基因特异引物 GSP-*PACaM*5'、GSP-*AsCaM*5'、GSP-*PACaM*3'、GSP-*AsCaM*3' (表 2)。用 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen) 及 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒, 按试剂盒说明书进行操作, 利用设计特异引物与通用引物配合进行 PCR 扩增, 其中, 通用引物包括 Abridged Anchor Primer (10 μmol/L), Anchor Primer (10 μmol/L), AUAP 和 UAP (10 μmol/L), 与 GSP-*PACaM*5'、GSP-*AsCaM*5' 搭配来分别扩增 *PACaM* 与 *AsCaM* 的 5'-端 cDNA 序列, 10×Universal Primer A Mix (UPM) 和 GSP-*PACaM*3'、GSP-*AsCaM*3' 被用来分别扩增获得 *PACaM* 与 *AsCaM* 的 3'端 cDNA 序列。PCR 产物经检测、克隆、验证及测序列等步骤后, 获得该基因的 5'端及 3'端序列。

应用 DNASTar Lasergene 7.1 软件, 分别组装 *PACaM* 与 *AsCaM* 基因的 5'-RACE 片段、中间片段和 3'-RACE 片段, 拼接生成 *PACaM* 与 *AsCaM* 基因的 cDNA 全长序列。

1.3 *PACaM* 与 *AsCaM* 基因与蛋白的序列分析

CaM 基因 cDNA 的开放阅读框(open reading frame, ORF)查找使用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/>)。信号肽预测分析采用 SignalP

表 1 鲷样品的体长和体重
Tab. 1 Body length and body weights of sea porgy

$\bar{x} \pm SD; n = 5$

样本名称 sample name	体重/g body weight	体长/cm body length
黑鲷仔鱼 larvae of <i>Acanthopagrus schlegelii</i>	0.039±0.0005	0.7±0.05
黑鲷♀×真鲷♂仔鱼 hybrid larvae of <i>A. schlegelii</i> ♀ × <i>Pagrosomus major</i> ♂	0.042±0.0007	1.0±0.05
黑鲷成鱼 adults of <i>A. schlegelii</i>	361.81±26.8	22.8±0.5
黑鲷♀×真鲷♂成鱼 hybrid adults of <i>A. schlegelii</i> ♀ × <i>P. major</i> ♂	489.8±25.3	24.5±0.5

表 2 *CaM* 基因 cDNA 片段扩增与荧光定量 PCR 的引物与扩增片段长度

Tab. 2 Primers used for *CaM* genes cloning and fluorescence real-time quantitative PCR and the length of PCR amplicons

扩增片段 application	引物 primer	引物序列(5'→3') primer sequence (5'→3')	扩增片段长度/bp amplicon length
中间片段 intermediate fragments	CaMF	GARGARCAGATYGCWGARTTCAA	365
	CaMR	TCYCTRATCATYTCRTCHACTTC	
5'-RACE	5'-RACE a bridged anchor primer	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGG	188 (<i>PACaM</i>) 269 (<i>AsCaM</i>)
	AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	
	UAP	CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTAC	
	5'-RACE anchor primer	CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGG	
	GSP- <i>PACaM</i> 5'	GAGCTGCGCCATGTGATGACAAACC	
	GSP- <i>AsCaM</i> 5'	GAAACCACCACTACCACG	
3'-RACE	3'-RACE 10×universal primer A	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	774 (<i>PACaM</i>) 836 (<i>AsCaM</i>)
	Mix(UPM)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
	GSP- <i>PACaM</i> 3'	GAAACCACCACTACCACG	
	GSP- <i>AsCaM</i> 3'	GAGCTGCGCCATGTGATGACAAACC	
RT-qPCR	<i>PACaM</i> F	CACCATCACCAACAAAGAGC	171 (<i>PACaM</i>)
	<i>PACaM</i> R	TCGCTGTCTGTGTCTTCAT	
	<i>AsCaM</i> F	ATGCCGATGGAAATGGAACG	180 (<i>AsCaM</i>)
	<i>AsCaM</i> R	GCTTCTCCCAAGGTTTGTC	
	ActinF	TATCGTCATGGACTCCGGTG	
	ActinR	TGATGTCACGCACGATTTC	

(www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)^[17-18]。分子量与理论等电点预测采用 ExPASy 在线服务器的 Compute pI/Mw 工具(http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)。CaM 蛋白的亚细胞定位采用 PSORTII 软件(<http://psort.ims.utokyo.ac.jp/form2.html>)。Motif 搜索使用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。三级结构预测使用 SWISS-MODEL 服务器(<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>)^[19]。*PACaM* 与 *AsCaM* 基因全长 cDNA 序列的同源性分析及 *CaM* 基因的氨基酸序列相似性搜索与下载, 采用在 NCBI 网站运行 BLAST 程序^[20]。搜索结果都经过核实并进行聚类分析。利用 Mega 6.0 软件^[21]中提供的比对功能进行多序列比对并基于邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建系统进化树, bootstrap 重复 1000 次。

1.4 *PACaM* 与 *AsCaM* 基因的 mRNA 表达差异分析

根据已获得的 *PACaM* 与 *AsCaM* 基因全长 cDNA 序列, 分别设计 2 对特异性引物 *PACaM*F/*PACaM*R 和 *AsCaM*F/*AsCaM*R(表 2), 用于实时荧光定量 PCR, 内参基因引物为 ActinF/ActinR(表

2)。通过 IO-RAD CFX Connect™ 荧光定量 PCR 检测系统, 测定目的基因在 PA 与 As 不同组织样品中的表达情况。荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL, 以各个样本的 cDNA 为模板, 反应程序为: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 10 s, 58℃ 20 s, 72℃ 20 s, 75℃ 5 s 并采集荧光信号, 40 个循环; 添加溶解曲线生成程序: 95℃ 到 65℃ 每降 0.5℃ (5 s) 采集一次荧光。样品和内参均设 3 个重复。实验结束后, 用溶解曲线分析产物专一性, 结果用 2^{-ΔΔC_T} 法进行初步数据统计分析。用 Prism 5 Software(GraphPad) 分析软件进行图表与数据统计, 以 Student's *t*-test 分析数据的差异性(*P*<0.05 为差异显著)。

2 结果与分析

2.1 *PACaM* 与 *AsCaM* 基因 cDNA 全长序列的克隆与分析

利用 *CaM* 基因保守序列设计简并引物, 扩增获得的 *CaM* 基因中间片段(365 bp), 进一步设计引物、PCR 扩增及测序等程序, 获得 *PACaM* 和 *AsCaM* 的 5'端及 3'端序列(表 2), 软件拼接获得长度分别为 1180 bp 和 1241 bp 的 *PACaM* 和 *AsCaM*

Consistency sequence were presented by shadow, different sites and sequences were presented by single point and blue colour.

AsCaM	MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSL	40
PACaM	MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSL	40
Consensumadqlteeqiaefkeafslfdkdgdgtitttkelgtvmrsl		
AsCaM	GQNPTEAEIQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMARKMKDT	80
PACaM	GQNPTEAEIQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMARKMKDT	80
ConsensusgqnpTEAEIQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMARKMKDT		
AsCaM	DSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDE	120
PACaM	DSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDE	120
ConsensusdseeeireafrvfdkdngngyisaaelrhvmtnlgekltdE		
AsCaM	EVDEMIREADIDGGQVNYEEFVQMMTA	148
PACaM	EVDEMIREADIDGGQVNYEEFVQMMTA	148
Consensusuevdemireadidggqvnnyeeefvqmmta		

图 2 AsCaM 与 PACaM 蛋白氨基酸序列比对
阴影表示相同氨基酸.

Fig. 2 Alignment of PACaM and PPCaM amino acids sequences
Consistency sequence were presented by shadow.

spartitus(XM_008276530.1)及 *Notothenia coriiceps* (XM_010788155.1)等鱼类的 CaM 基因同源相似性都为 95%, 基因的氨基酸序列与大黄鱼(*Larimichthys crocea*, KKF28235.1)、*Esox lucius*(NP_001290903.1)及 *Oncorhynchus mykiss*(CDQ87622.1)等鱼类的相似度为 99%。基于邻接法对 AsCaM 与其他 23 种鱼类 28 个 mRNA 序列(表 3)的 CaM 序列进行系统聚类分析, 构建的 NJ 拓扑树(图 3)。

2.2 PACaM 与 AsCaM 蛋白质基本属性与功能结构分析

PACaM 与 AsCaM 的蛋白氨基酸序列完全一致。对黑鲷 AsCaM 蛋白理化性质进行分析, 表明 CaM 分子式为 C₇₁₉H₁₁₂₉N₁₈₉O₂₅₆S₁₀, 蛋白的分子量约为 16.84 kD, 理论等电点 pI 为 4.09; 不稳定指数为 28.21 (小于 40), 属稳定蛋白; 脂肪指数为 65.5; 不含有信号肽序列, 为非分泌型蛋白。AsCaM 蛋白的亚细胞定位于细胞质中的可能性最大(52.2%), 为非线粒体蛋白, 无跨膜区, 无核定位信号。

功能域分析表明 AsCaM 蛋白含有 4 个 EF-hand 结构域, 属于 EF-hand 家族, 有 16 个 Ga²⁺ 结合位点(图 4a)。同源建模获得 AsCaM 蛋白的三维结构(图 4b~c), 显示 AsCaM 蛋白包括 7 个 α 螺旋和 4 个 β 折叠。

2.3 PACaM 与 AsCaM 基因 mRNA 差异表达分析

CaM 在仔鱼及成鱼的脑、鳃、肝、肾、性腺和肌肉等组织中均有表达, 其中表达量相对较高的为仔鱼及成鱼的脑与性腺(图 5)。PACaM 依次

表 3 用于黑鲷 AsCaM 基因系统进化分析的其他
鱼类钙调蛋白 mRNA 序列登录号

Tab. 3 Accession number of other fishes CaM mRNA
sequences for phylogenetic analysis with AsCaM gene
of *Acanthopagrus schlegeli*

物种 species	登录号 accession number
复瓦眶锯雀鲷 <i>Stegastes partitus</i>	XM_008276530.1
褐牙鲷 <i>Paralichthys olivaceus</i>	EU519228.1
尖吻鲈 <i>Lates calcarifer</i>	XM_018694615.1
褐菖鲉 <i>Sebastiscus marmoratus</i>	EU871679.1
南极鳕 <i>Nototheniacoriiceps</i>	XM_010788155.1
点带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	KC540636.1
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	XM_010739665.2, XM_019257339.1
褐石斑鱼 <i>Epinephelus bruneus</i>	JF430618.1
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	XM_003452322.4
伯氏朴丽鱼 <i>Haplochromis burtoni</i>	XM_005936862.2
布氏亮丽鲷 <i>Neolamprologus brichardi</i>	XM_006799078.1
斑马鱼 <i>Maylandia zebra</i>	XM_004554577.3
红丽鱼 <i>Pundamilia nyererei</i>	XM_005735127.1
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	XM_008321317.2
杂色鲮 <i>Cyprinodon variegatus</i>	XM_015373659.1, XM_015373658.1
底鲮 <i>Cyprinodon variegatus</i>	XM_012862386.1
花鲮 <i>Poecilia formosa</i>	XM_007577169.2
短鳍花鲮 <i>Poecilia mexicana</i>	XM_015007947.1
青鲮 <i>Oryzia slatipes</i>	XM_004076927.1
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	XM_014200496.1, BT149934.1, BT125344.1, BT043796.1
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	BT074083.1, BT074184.1
墨西哥脂鲤 <i>Astyanax mexicanus</i>	XM_007255786.2

在仔鱼、脑、鳃及性腺中表达水平较高, 在肝、肾和肌肉中的表达量低且相互不存在显著差异 ($P>0.05$); 在仔鱼中的表达量显著高于在 2 龄成鱼个体各组织中的表达量 ($P<0.01$)。AsCaM 在性腺中表达水平显著高于脑和仔鱼 ($P<0.05$), 极显著高于肝、肾、鳃及肌肉组织 ($P<0.01$), 肝、肾、鳃与肌肉组织间不存在明显差异表达。CaM 在反交鱼与黑鲷不同组织中的定量表达结果比较表明, 在黑鲷与反交子代两者中的 CaM 表达有相似之处, 如在仔鱼及成鱼的脑组织中有较高表达量, 在肾及肌肉中的表达相对低, 在脑、肝与肾间的表达量没有明显差异 ($P>0.05$); 同时, 2 种鱼中该基因的表达又有明显差异, 如在黑鲷性腺中的表

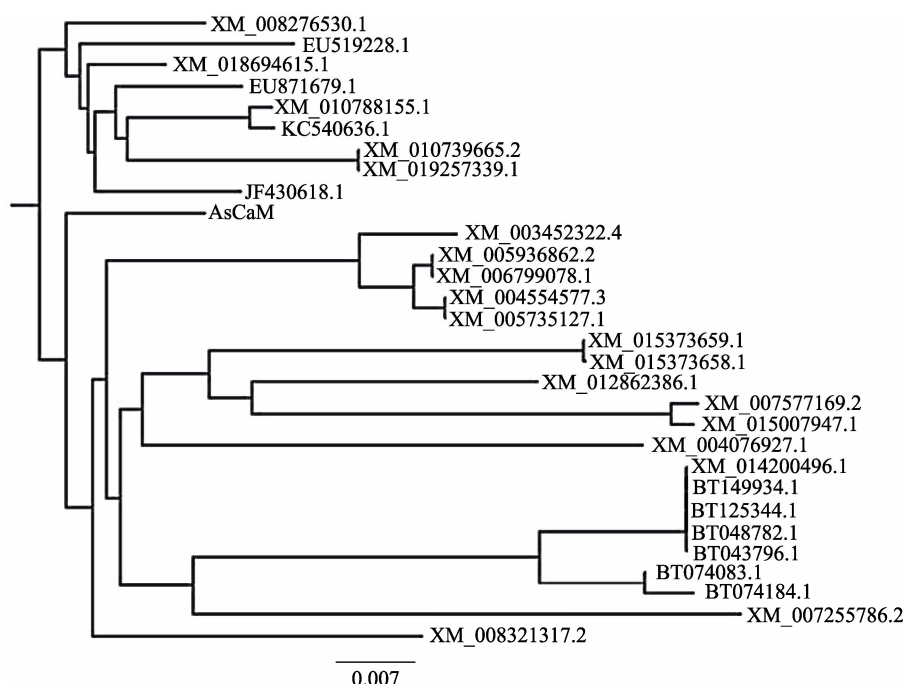


图 3 黑鲷 AsCaM 与其他鱼类 CaM 基因 mRNA 序列的聚类树状图

利用 Mega 6.0 软件中的比对功能进行多序列比对并基于邻接法(neighbor-joining method)构建系统进化树, bootstrap 重复 1000 次, 标尺为进化距离。

Fig. 3 Phylogenetic neighbor-joining tree of AsCaM and other fishes representative CaM mRNA sequences of *Acanthopagrus schlegelii*. The phylogenetic tree was constructed using the neighbour-joining method and analysed using the Poisson correction models with 1000 bootstrap replicates in MEGA 6.0. The scale bar corresponds to 0.01 estimated amino acid substitutions per site.

达量最大, 且极显著高于在反交子代性腺中的表达量; 在反交子代中则是仔鱼表达量最高, 而且在仔鱼及成鱼的鳃及肌肉组织中的表达水平, 均有极显著($P < 0.01$)高于在黑鲷中相应的表达(图 5)。

3 讨论

实验得到的 2 个基因全长 cDNA 序列中, ORF 序列相差仅为 2 个碱基(C/T), 在氨基酸水平完全相同; PACaM 与 AsCaM 的氨基酸序列与其他鱼类的相似性为 97% 以上, 如与大黄鱼的 CaM 氨基酸序列的相似性为 99%, 显示了 CaM 的保守性。庞俊峰等^[22]利用克隆的木榄(*Bruguiera gymnorhiza*)的 BgCaM 氨基酸, 与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、甘薯(*Dioscorea esculenta*)、桑树(*Morus alba*)、大麦(*Hordeum vulgare*)和甘蔗(*Saccharum officinarum*)等比较得到的同源性约为 98%, 而且这些种类的基因 ORF 序列差别也多为碱基 C 和 T 之间的同义替换。有报道总结得出动植物间的 CaM 氨基酸序列的相似度在 90% 以上^[12]。钙调蛋

白这种高保守性可以由它参与细胞活动之多、在细胞功能行使中地位之重要来解释^[23]。CaM 因其功能的重要性而结构保守, 包括其具有的特殊 EF-hand 结构域^[24]。EF-hand 多基因家族的蛋白结构有 2 个、4 个或 6 个 EF-hand, 成对的 EF-hand 之间可以相互沟通, 显示正向协同效应^[25-26]。不过, 在长牡蛎等贝类中有 3 个 EF-hand 结构^[10]。PACaM 与 AsCaM 基因有 4 个 EF-hand 手性结构域, 可以结合 16 个 Ca^{2+} 位点。

不过 2 个基因在 3' 非编码序列则有较多差异位点, 且 AsCaM 的 3' 非编码序列长度比 PACaM 的多 62 bp。有报道 CaM 基因不同亚型的差异部位可能就存在于非编码区^[27]。基因的 5' 或 3' 端区域可以独自或者协同作用调节基因表达^[28], 也可以启动基因的组织特异性表达^[29]; 实际上, 这些非编码 DNA 才是遗传中心, 正是由它们决定基因何时何地何量表达, 以及如何高效生产出各种蛋白质^[30]。

从成鱼 6 个不同组织的定量分析结果发现,

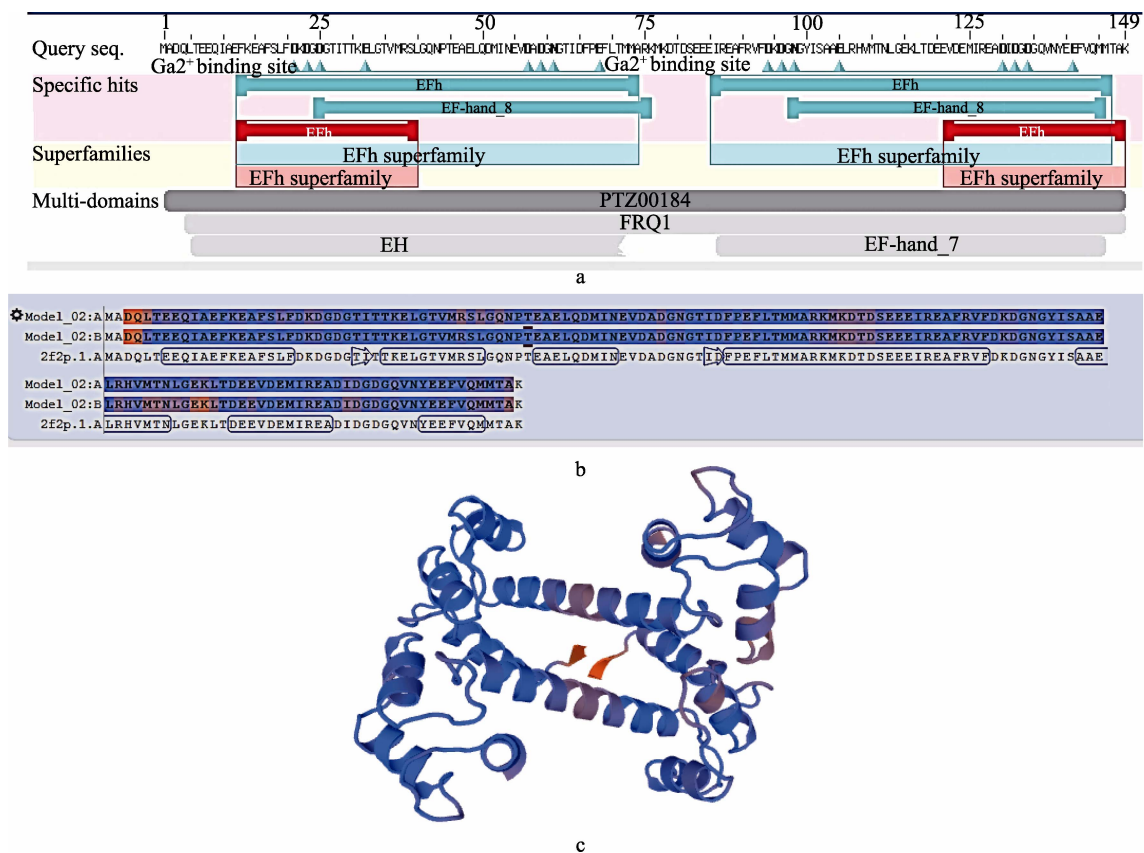


图 4 黑鲷 AsCaM 蛋白功能域与三维结构预测结果

a. 基因结构域; b. 氨基酸基序; c. 蛋白三级结构.

Fig. 4 The predicted three-dimensional structure and function domains analysis results of AsCaM protein search from *Acanthopagrus schlegeli*

a. gene structure; b. protein motifs; c. three-dimensional structure of the protein.

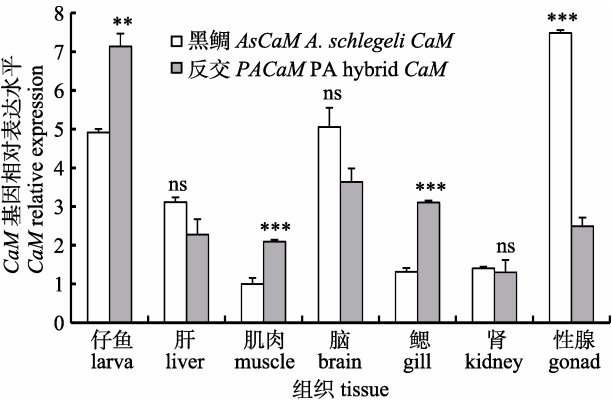


图 5 *PACaM* 和 *AsCaM* 的定量表达水平与差异比较
数值用平均值±标准误表示; ns 表示无显著差异,
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Fig. 5 Relative expression results of *PACaM* and *AsCaM*
Values are expressed as mean $\pm$ SE. ns means no significant differences, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

CaM 在反交鱼及黑鲷的脑、肝与肾等关键器官中的表达没有明显差异, 这与 *CaM* 的功能重要性而

呈现的稳定性相对应。研究表明 *CaM* 在脊椎动物脑中的含量最丰富^[31]。 Ca^{2+} 在神经系统中占有重要地位, 是通过与细胞内的特殊受体蛋白结合发挥作用, 而 *CaM* 是最重要的 Ca^{2+} 受体蛋白^[32]。杜喆等^[33]利用新生小鼠大脑皮层的神经干细胞研究发现, *CaM* 的表达对神经元的生长和发育起着重要作用。本研究也得出 *CaM* 在反交鱼及黑鲷的脑组织中均有明显高于肝、肾、鳃、肌肉等组织的表达水平。另外, 仔鱼中的 *CaM* 也有较高表达量, 仔鱼期是鱼类快速生长阶段, 推测 *CaM* 对鱼早期生长具有较高的阶段性调控作用。反交仔鱼的 *CaM* 显著高于黑鲷仔鱼的表达量, 同样培育日龄的反交仔鱼生长速度快于黑鲷仔鱼, 该进一步体现了 *CaM* 基因在鱼类生长中的作用。 $\text{CaM}/\text{Ca}^{2+}$ 具有参与调控酶活性、促进细胞增殖的作用^[34]。Taft 等^[35]通过调控 *CaM* 表达量的血吸虫(*Schisto-*

somamansoni) 幼虫早期发育不良和生长缺失诱导 (defect-inducing) 的 RNAi 实验, 显示了 *CaM* 在幼虫早期发育中的重要作用。再者, 在性腺、鳃、肌肉及仔鱼中, 反交鱼的肌肉及鳃中的 *CaM* 表达水平显著性高于黑鲷, 也为该杂交子代相对于亲本黑鲷成鱼的生长优势提供了一些分子水平上的研究资料。黑鲷性腺组织的 *CaM* 表达显著高于杂交鱼, 这一方面是由于 *CaM* 参与有关生殖的许多重要生化过程^[11, 32]; 另一方面, 可能是由于生长与生殖在一定程度上有相互为负调控的关系, *CaM* 基因在性腺中的高表达伴随有在生长性状等方面低于反交鱼的态势。同时, 从黑鲷母本对反交子代在性腺上的极显著差异性高表达, 体现了属间杂交可能导致的在生殖腺发育上的明显变化, 值得引起下一步关注与研究。

参考文献:

- [1] Liang J. The research progress of calmodulin[J]. Journal of Clinical Stomatology, 2010, 26(8): 500–501. [梁婧. 钙调蛋白的研究进展[J]. 临床口腔医学杂志, 2010, 26(8): 500–501.]
- [2] Hu W Q. Study of the function on CaMBP10 and its effect on the regulation of CaM[D]. Tianjin: Nankai University, 2009. [胡文全. 钙调素结合蛋白 CaMBP10 的功能研究及其 CaM 的调节作用[D]. 天津: 南开大学, 2009.]
- [3] Li Y, Cai Y Q, Yue J J, et al. Study on the functional motions of calmdulin[J]. Letters in Biotechnology, 2015, 26(1): 74–77, 145. [李彦, 蔡永琴, 岳俊杰, 等. 钙调蛋白的功能性运动分析[J]. 生物技术通讯, 2015, 26(1): 74–77, 145.]
- [4] Corcoran E E, Means A R. Defining Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase cascades in transcriptional regulation[J]. J Biol Chem, 2001, 276(5): 2975–2978.
- [5] Hoeflich K P, Ikura M. Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms[J]. Cell, 2002, 108(6): 739–742.
- [6] Gu X, Chen Y M, Zhang J M. Calmodulin structure and the research progress of function of neurobiology[J]. Chongqing Medicine, 2008, 37(17): 1995–1997. [顾香, 陈阳美, 张杰敏. 钙调蛋白结构及其神经生物学功能的研究进展[J]. 重庆医学, 2008, 37(17): 1995–1997.]
- [7] Chi F. Features and localization of cell CaMBP-10 expression in plants distribution[D]. Tianjin: Nankai University, 2003. [池方. CaMBP-10 在植物中分布表达特征及细胞定位研究[D]. 天津: 南开大学, 2003.]
- [8] Zhang L T, Lv J J, Gao B Q, et al. Cloning and expression analysis of *Portunus trituberculatus* calmodulin cDNA[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(6): 1150–1159. [张龙涛, 吕建建, 高保全, 等. 三疣梭子蟹钙调蛋白基因的克隆及在蜕皮中的功能分析[J]. 中国水产科学, 2015, 22(6): 1150–1159.]
- [9] Li Y, Li S G, Xie L P, et al. Molecular cloning of calmodulin-like protein gene CaLP and comparison with expression profiles of CaM gene in scallop *Chlamys farreri*[J]. Fisheries Science, 2014, 33(11): 692–701. [林亚, 李世国, 谢莉萍, 等. 栉孔扇贝钙调素类似蛋白基因的克隆及其与钙调素基因表达特征的比较分析[J]. 水产科学, 2014, 33(11): 692–701.]
- [10] Li X X, Yu W C, Cai Z Q, et al. Molecular cloning and characterization of full-length cDNA of calmodulin gene from pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 1–7.
- [11] Li S, Xie L, Zhang C, et al. Cloning and expression of a pivotal calcium metabolism regulator: calmodulin involved in shell formation from pearl oyster (*Pinctada fucata*)[J]. Comp Biochem Phys B, 2004, 138(3): 235–243.
- [12] Yu X R, Qiu X M, Chang Y Q, et al. Cloning and polymorphism analysis of calmodulin (CaM) gene obtained from *Crassostrea gigas*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2012, 43(6): 855–860. [于旭蓉, 仇雪梅, 常亚青, 等. 长牡蛎钙调蛋白基因克隆及多态性分析[J]. 南方农业学报, 2012, 43(6): 855–860.]
- [13] Li S W, Wen J J, Pang L, et al. Cloning and screening of differentially expressed genes from sex-reversed gonad of *Epinephelus akaara*[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 20(2): 189–194. [李尚伟, 文建军, 庞岚, 等. 性逆转石斑鱼性腺差异表达基因的克隆和筛选[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(2): 189–194.]
- [14] Jiang S G, Shu T F, Xia J H, et al. Resources and Utilization of the Sparidae from Chinese Offshore[M]. Beijing: The Ocean Publishing Company, 2012. [江世贵, 苏天凤, 夏军红, 等. 中国近海鲷科鱼类种质资源及其利用[M]. 北京: 海洋出版社, 2012.]
- [15] Yan F Y, Xu S L, Gu J W, et al. Comparison of metabolic and excretion rates of young *Sparus macrocephalus* and young hybrid porgy[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2010, 29(4): 496–502. [颜付云, 徐善良, 谷江稳, 等. 杂交鲷和黑鲷幼鱼的代谢率及排泄率比较[J]. 台湾海峡, 2010, 29(4): 496–502.]
- [16] Jiang H L, Wu X F. Comparative study on temperature tolerance and growth between *Parus major* (Temmincket Schlegel) and *Spraus macrocephalus* and F₁ hybrid[J]. Mod-

- ern Fishery Information, 2009, 24(2): 26–28. [蒋宏雷, 吴雄飞. 真鲷与黑鲷及杂交 F_1 耐受温度、生长比较[J]. 现代渔业信息, 2009, 24(2): 26–28.]
- [17] Bendtsen J D, Nielsen H, von Heijne G, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0[J]. *J Mol Biol*, 2004, 340(4): 783–795.
- [18] Nielsen H, Krogh A. Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model[J]. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 1998(6): 122–130.
- [19] Schwede T. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3381–3385.
- [20] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(17): 3389–3402.
- [21] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725–2729.
- [22] Pang J F, Yu Z, Zhang Z L, et al. The cloning and research of *CaM* on *Bruguiera gymnorrhiza*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010, 12: 126–131. [庞俊峰, 于卓, 张占路, 等. 木榄 *CaM* 基因的克隆及序列分析[J]. 生物技术通报, 2010, 12: 126–131.]
- [23] Li W H, Ren C H, Hu C Q, et al. cDNA cloning and tissue distribution of calmodulin from seacucumber (*Stichopus monotuberculatus*)[J]. *South China Fisheries Science*, 2014, 10(5): 75–81. [李五湖, 任春华, 胡超群, 等. 花刺参钙调蛋白 cDNA 克隆及组织分布[J]. 南方水产科学, 2014, 10(5): 75–81.]
- [24] Toutenhoofd S L, Strehler E E. The calmodulin multigene family as a unique case of genetic redundancy: multiple levels of regulation to provide spatial and temporal control of calmodulin pools[J]. *Cell Calcium*, 2000, 28(2): 83–96.
- [25] Gifford J L, Walsh M P, Vogel H J. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca^{2+} -binding helix-loop-helix EF-hand motifs[J]. *Biochem J*, 2007, 405(2): 199–221.
- [26] Luo M, Dong Z Y, Bin S Y, et al. Molecular cloning and bioinformatics analysis of calmodulin genes in *Phenacoccus solenopsis* Tinsley[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2012, 31(3): 320–324. [罗梅, 董章勇, 宾淑英, 等. 扶桑绵粉蚧钙调蛋白基因的克隆与生物信息学分析[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(3): 320–324.]
- [27] Feng R, Liu Y, Yang L, et al. Cloning of the coding region and 3' non-coding region of calmodulin 2 in guinea pig[J]. *Journal of China Medical University*, 2015, 44(2): 123–126. [封瑞, 刘彦, 杨磊, 等. 豚鼠钙调蛋白 2 基因编码区及 3' 端非编码区序列克隆[J]. 中国医科大学学报, 2015, 44(2): 123–126.]
- [28] Mullapudi N, Joseph S J, Kissinger J C. Identification and functional characterization of *cis*-regulatory elements in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*[J]. *Genome Biol*, 2009, 10(4): R34.
- [29] Narlikar L, Ovcharenko I. Identifying regulatory elements in eukaryotic genomes[J]. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2009, 8(4): 215–230.
- [30] Qin D, Xu C S. Characterization and identification of functional elements in non-coding DNA sequences[J]. *Hereties*, 2013, 35(11): 1253–1264. [秦丹, 徐存拴. 非编码 DNA 序列的功能及其鉴定[J]. 遗传, 2013, 35(11): 1253–1264.]
- [31] Seto-Ohshima A, Kitajima S, Sano M, et al. Immunohistochemical appearance of calmodulin in the developing brain: a comparison with neuron specific enolase[J]. *Cell Struct Funct*, 1984, 9(4): 337–344.
- [32] Zhang C G. Calmodulin and regulation of cellular function[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 1982, 4(1): 14–18. [张崇高. 钙调蛋白与细胞功能的调节[J]. 细胞生物学杂志, 1982, 4(1): 14–18.]
- [33] Du J, Xu Y H, Shi Y X. Changes of calmodulin in committed differentiation of cortex neural stem cells[J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2005, 14(6): 653–657. [杜喆, 徐延豪, 石玉秀. 大脑皮层神经干细胞定向分化为神经元过程中钙调蛋白的表达[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2005, 14(6): 653–657.]
- [34] Zayzafoon M. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 97(1): 56–70.
- [35] Taft A S, Yoshino T P. Cloning and functional characterization of two calmodulin genes during larval development in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*[J]. *J Parasitol*, 2011, 97(1): 72–81.

Molecular cloning, mRNA expression, and characterization of calmodulin genes in hybrids of *Acanthopagrus schlegeli* (♀)×*Pagrosomus major* (♂)

CHEN Shuyin¹, LI Peng², ZHANG Zhiyong¹, XU Jin¹, ZHU Fei¹, JIA Chaofeng¹, WANG Siting², REN Zhonghong¹

1. Institute of Oceanology & Marine Fisheries, Nantong 226007, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China

Abstract: The hybrid offspring from black porgy (*Acanthopagrus schlegeli* ♀) and red porgy (*Pagrosomus major* ♂) have been successfully farmed in an attempt to develop new marine aquaculture species with optimal target traits. To analyze the molecular mechanism of different growth traits between *A. schlegeli* parent fish (As) and hybrids (PA), the full-length cDNA sequences of *CaM* genes (named *PACaM* and *AsCaM*) from each were cloned and identified. The expression profiles of *CaM* genes in six different tissues of two-year-old and 30 d larvae of F1 generation hybrids and pure *A. schlegeli* individuals were evaluated and compared using real-time quantitative PCR. The *PACaM* gene is 1180 base pair (bp) in length and the *AsCaM* gene is 1241 bp, both including an open reading frame (ORF) of 450 bp and encoding a peptide of 149 amino acids with an estimated molecular mass of 16.84 kD and a predicted isoelectric point (pI) of 4.09. Sequence alignment, structure comparison, and bioinformatics analyses showed that *PACaM* and *AsCaM* are members of the *CaM* family. Functional domain analysis indicated that the protein has four EF-h and calcium-binding domains, with sixteen Ca²⁺ binding sites. *PACaM* and *AsCaM* are non-secretory and non-transmembrane proteins, and likely have their functional location in the cytoplasm. Quantification of expressed *CaM* mRNA showed comparatively high levels in the brain and gonadal tissues of two-year-old fish and in larval fish. *PACaM* mRNA expression was significantly different from *AsCaM* in gill, muscle, and gonadal tissue, as well as in larvae, but not significantly different in the brain, liver, or kidney tissues ($P>0.05$). The stage-specific enrichment of *PACaM* transcripts in the hybrid larvae, and the highest enrichment of *AsCaM* in the gonad, may signify an essential role for *CaM* in growth and development. This study provides a basis for further research into gene function and differing genetic traits between the parent and hybrid offspring of genus crosses of Sparidae.

Key words: *Acanthopagrus schlegeli*; *Acanthopagrus schlegeli*×*Pagrosomus major* hybridization; calmodulin; gene clone; mRNA expression