

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14554

三疣梭子蟹钙调蛋白基因的克隆及在蜕皮中的功能分析

张龙涛^{1,3}, 吕建建^{1,2}, 高保全^{1,2}, 刘萍^{1,2}

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071

3. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 基于转录组数据库信息, 采用 RACE 技术克隆获得三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)钙调蛋白基因(*PTCaM*)。该基因 cDNA 全长 1981 bp, 包含 450 bp 的开放阅读框, 编码 149 个氨基酸, 预测分子量 16.8 kD, 理论等电点为 4.09。对序列进行生物信息学分析发现, *PTCaM* 是一个高度保守的序列, 具有 EF 家族典型的 EF-hand 钙离子结合域。同源性分析结果表明, *PTCaM* 基因编码的氨基酸与果蝇和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的 CaM 氨基酸序列覆盖率达 100%, 与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)和仿刺参(*Apostichopus japonicus*)覆盖率达 99%。系统进化表明, *PTCaM* 基因氨基酸序列与凡纳滨对虾、中华绒螯蟹和克氏原螯虾聚为一支。通过分析不同蜕皮时期各个组织中 *PTCaM* 的表达情况得知, 该基因在蜕皮时期的各个组织中均出现差异性表达, 并且差异显著, 说明该基因参与蜕皮调控过程。

关键词: 三疣梭子蟹; 钙调蛋白; 基因克隆; 基因表达; 去眼柄

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)06-1150-10

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)隶属于甲壳纲(Crustacea), 十足目(Decapoda), 梭子蟹科(Portunidae), 主要栖息在中国、日本、朝鲜等沿海海域及入海口, 属于广盐性蟹类^[1]。三疣梭子蟹肉质饱满、鲜美, 营养丰富, 是一种十分受欢迎的海产食用蟹类。三疣梭子蟹在我国具有广泛的资源分布和养殖面积, 养殖产量和出口量世界第一, 已成为我国海水养殖的主导品种之一^[2]。甲壳类生长过程中要多次经历蜕皮, 并伴随着个体体型的增大, 性腺的发育等变化, 更有如附肢的再生这样特殊的生理过程。该过程主要是由位于甲壳类眼柄中的 X 器-窦腺复合体进行调控, 它能分泌对蜕皮进行调控的多肽物质: 蜕皮抑制激素(MIH), 从而影响血淋巴中的蜕皮激素含量, 调节蜕皮的正常进行。国内外进行了许多切除单侧

眼柄的实验来诱导甲壳类的蜕皮, 以探寻一种可行的人工调控技术。甲壳类蜕皮是由多基因的共同调控才能顺利进行, 了解并阐明参与蜕皮调控的基因的功能, 将有助于完善甲壳类的蜕皮机制。

钙调蛋白(calmodulin, CaM)是一类在进化上呈很强保守性的蛋白。有研究表明, 原生动物的钙调蛋白与脊椎动物的相比, 也只有 11 个氨基酸残基被取代, 1 个氨基酸残基缺失。真核生物之间的钙调蛋白显示出免疫交叉反应^[3]。有学者猜想, 这种结构上的突变是很容易致死的, 因此才会在进化中始终保持结构的保守性。钙调蛋白本身没有酶的活性, 在没有 Ca^{2+} 存在的情况下, 没有生物活性。但是实验证明, Ca^{2+} -CaM 复合物能与靶蛋白结合形成一个活性全酶^[4]。钙调蛋白的二级结构含有高度的 α 螺旋, 2 条 α 螺旋与 Ca^{2+} 结合的

收稿日期: 2014-12-24; 修订日期: 2015-01-26.

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA10A409); 国家自然科学基金项目(41306177).

作者简介: 张龙涛(1989-), 男, 硕士研究生, 主要从事海水养殖生物种质资源与遗传育种研究. E-mail: zhanglongt@126.com

通信作者: 刘萍, 研究员. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

结构通常被称为“EF-hand”。这些结构和功能与 Ca^{2+} 具有紧密联系性, 使其在 Ca^{2+} 的调节上具有不可替代的作用^[5]。钙调蛋白最先在小鼠脑中被发现, 其对环腺苷酸磷酸二酯酶具有催化作用^[6]。在此之后, 对各种动植物的研究表明, 钙调蛋白也参与到多种生命活动和生理反应过程之中, 如细胞的分裂和代谢、细胞的运动、生殖发育等^[7-8]。有学者也证实了, 在果蝇(*Drosophila melanogaster*)体内钙的储存由钙调蛋白来调节, 同时参与了神经递质的合成与释放^[9]。此外, 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、紫贻贝(*Mytilus edulis*)、三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)钙调蛋白基因的克隆及功能研究也表明, 钙调蛋白对钙离子的获取和转运过程起着非常重要的作用^[10]。目前, 甲壳类的中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*, GenBank 登录号: KJ577632.1)和克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*, ACI15835.1)克隆出钙调蛋白基因。

Chen 等^[11]提出了钙离子信号正向调节蜕皮的观点, 并且发现在一个自然的蜕皮周期里, 钙离子水平的整体变化趋势与蜕皮激素浓度变化相一致。Gao 等^[12]的研究表明, 钙调蛋白在蜕皮周期的表达水平呈现波动, 推测钙调蛋白在功能上与蜕皮相联系, 但是相关的功能与调控作用有待于深入的研究。许多研究结果也表明, 蜕皮的过程中除了 Ca^{2+} 的信号通路作用、催化作用, 更为标志性的存在 Ca^{2+} 的吸收与转运。由于钙调蛋白在 Ca^{2+} 的调节上具有至关重要的作用, 因此, 参考本实验室构建的三疣梭子蟹蜕皮相关基因的表达谱, 本研究选取三疣梭子蟹的钙调蛋白基因(*PTCaM*)进行克隆, 序列与表达分析, 并尝试探讨其在蜕皮过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用三疣梭子蟹取自中国水产科学研究院黄海水产研究所实验基地日照开航水产养殖有限公司, 体重(32±7) g。先暂养于室内圆柱形水泥池内, 暂养 3 d。每日定时换水, 投喂蛤类和野杂鱼。

1.2 实验试剂与引物

SMARTTM RACE Amplification Kit 和 Advantage 2 PCR Kit 购自 Clontech 公司; DNA 胶回收试剂盒购自北京 TIANGEN 公司; Trizol Regent、PrimeScript RT reagent Kit、PMD18-T 载体和 Top ten 感受态细胞购自 TaKaRa 公司; Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 和 FastStart Universal SYBR Green Master 荧光定量试剂购自 ROX 公司。

实验中用的引物均由上海生工生物有限公司合成(表 1), Rapid-amplification of cDNA ends 中的引物用 Primer Premier 5.0 软件设计。

表 1 实验中用到的引物
Tab. 1 The Sequences of the primer used in this experiment

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')
CaM-F	TCAGGTCAACTATGAAGAGTTCGTCACA
CaM-F2	AAGTGAAGTGATCGCGCCCACT
CaM-R	GCTACCACTACAGGGCGACAACAG
CaM-R2	AGTAGTTCTGTACATGGAGGCTGTATGGATA
QCaM-F	ACCTCACCTAACACCTTGG
QCaM-R	GCTTTCGCTTTCAATCAG
UPM Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGT ATCAACGCAGAGT
UPM Short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
β-actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCG
β-actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC
M13-F	TGTAACACGACGGCCAGT
M13-R	CAGGAAACAGCTATGACC

1.3 实验方法

1.3.1 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成 将三疣梭子蟹的肝胰腺、肌肉、眼柄、性腺组织按照 Trizol 试剂说明书提取总 RNA, 利用核酸定量仪和 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量以及完整性, 取等量的肝胰腺、肌肉、眼柄、性腺总 RNA 混合均匀, 按照 SMARTTM RACE Amplification Kit 说明书的方法步骤分别合成 3'RACE 和 5'RACE 的 cDNA 第一链。

1.3.2 EST 序列的验证 从高通量测序结果中选取钙调蛋白基因的 EST 序列, 用 Primer Premier

5.0 从两端设计正反向引物。用 Advantage 2 PCR Kit 进行 PCR 反应。反应程序为: 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 2 min, 25 个循环。将 PCR 产物纯化后送交上海桑尼公司测序, 将测序结果与 EST 序列进行比对。

1.3.3 *CaM* 基因全长 cDNA 的克隆 选取已经验证的 EST 序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'RACE 和 5'RACE 的特异性引物和巢式 PCR 反应的特异性引物。按照 Advantage 2 PCR Kit 试剂盒说明书, 3'RACE 利用特异性引物 CaM-F、通用引物 UPM 和 3'RACE 模板进行第一步 PCR 反应, 反应程序: 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 3 min, 27 个循环。将第一步 PCR 产物稀释 50 倍, 进行巢式 PCR 反应。同样地, 按照 3'RACE 的步骤, 进行 5'RACE 的反应。

将 3'RACE 和 5'RACE 的扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 切胶纯化并且连接到 PMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 Top ten 感受态细胞, 在培养基中 37℃ 过夜培养后, 挑取阳性菌落继续培养。进行菌落 PCR 后, 挑选含有目的条带的菌液送交上海桑尼公司测序。

1.3.4 生物信息学分析 利用 NCBI 中的 BLAST 主页程序进行主要的核苷酸序列以及氨基酸序列的比对。利用 Vector NTI 11.0 进行核苷酸序列的拼接比对、冗余序列的去除、开放阅读框的预测和氨基酸的翻译。利用 DNAMAN 进行氨基酸序列的比对。利用 SMRAT 和 InterProScan 进行蛋白质跨膜区的分析。利用 ProParam tool 进行氨基酸残基分析及蛋白质等电点、分子量预测等。分别利用 SOPMA 工具和 SWISS-MODEL 工具对 *PTCaM* 进行二级和三级结构预测。利用 MEGA 6.0 构建系统进化树。

1.3.5 蜕皮过程的分期及去除单侧眼柄实验 采用解剖镜观察三疣梭子蟹游泳足表皮生长状况的方法来区分不同蜕皮时期^[13]。取暂养后处于蜕皮间期、蜕皮前期、蜕皮后期的蟹各 6 只, 分别取其眼柄、肌肉、肝胰腺、心脏、血液、鳃, 存放于液氮中保存。

采用烫伤法去除三疣梭子蟹的单侧眼柄。将

烧红的镊子夹住蟹眼后红色膨大部分基部(此处为眼柄窦窝复合体)1~2 s, 破坏单侧眼柄的分泌及调控功能。用土霉素按照 50~100 mg/L 的浓度经行全池的消毒。暂养 7 d 后挑取处于蜕皮间期、蜕皮前期、蜕皮后期的蟹, 取其眼柄、肌肉、肝胰腺、心脏、血液、鳃, 存放于液氮中保存。

1.3.6 *CaM* 基因的表达定量分析 按照 Trizol 法提取 RNA 的步骤提取各个组织的总 RNA, 利用核酸定量仪和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和完整性, 使用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。

利用 Primer 软件设计 β -actin 基因和 *CaM* 基因的定量引物: β -actin-F、 β -actin-R、QCaM-F 和 QCaM-R(表 1)。采用 FastStart Universal SYBR Green Master 试剂, 在 ABI 7500 Real Time PCR 仪对各个组织的基因表达情况进行测定。反应体系为 10 μ L, 包括 5 μ L 的 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)、0.1 μ L 的正反向引物、3.8 μ L 的 PCR 反应水、1 μ L 的 cDNA。反应程序为 95℃ 10 min; 95℃ 10 s, 60℃ 34 s, 40 个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。以 β -actin 基因作为内参, 样本和内参均设置 3 个重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 *PTCaM* 基因的相对表达量, 使用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 *CaM* 基因 EST 序列的验证结果

验证出 *CaM* 基因 EST 中间 800 bp 序列为正确的拼接结果, 作为后续 RACE 试验的中间片段设计引物。测序结果与高通量拼接结果只有极少数碱基错误, 多次测序后更正错误碱基, 得到验证后的中间片段。

2.2 *CaM* 基因的 3'RACE 和 5'RACE 及全长 cDNA 的获得

3'RACE 和 5'RACE 最终的测序结果显示, 分别获得了 781 bp 和 500 bp 的 cDNA 片段。用 Vector 软件拼接得到的片段和 EST 序列, 去除冗余序列后得到三疣梭子蟹的 *CaM* 基因全长 cDNA 序列, 命名为 *PTCaM*, GenBank 登录号: JX855312.1。该

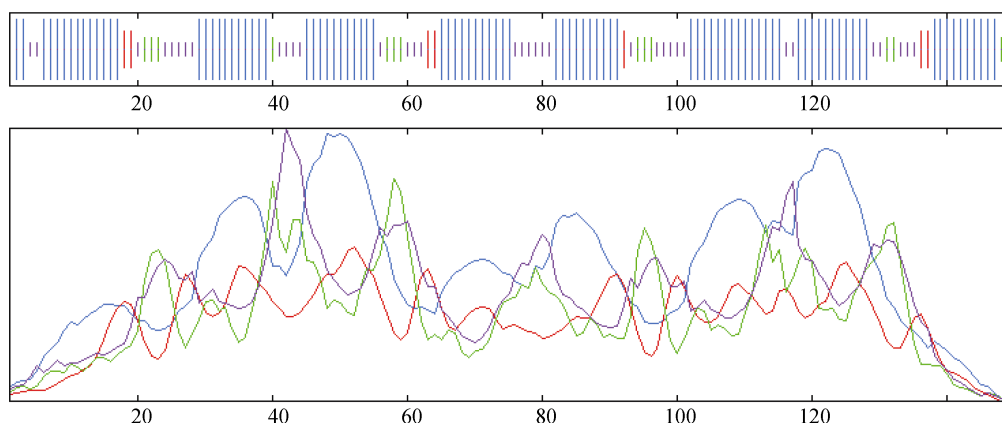


图 2 PTCaM 蛋白二级结构预测

蓝色: α 螺旋; 红色: 延伸链; 绿色: β 转角; 粉红: 不规则卷曲。

Fig. 2 Prediction of the secondary structure of PTCaM

Blue: alpha helix; Red: extended strand; Green: beta turn; pink: random coil.

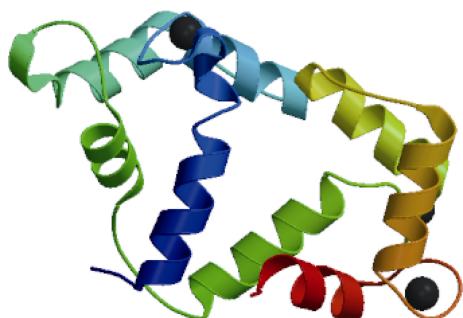


图 3 PTCaM 蛋白的三维结构预测

Fig. 3 3-D deduced structure of PTCaM protein

2.4 PTCaM 基因的同源性分析

将 *PTCaM* 基因开放阅读框推测的氨基酸序列在 NCBI 中的 Protein blast 比对, 结果显示, 钙调蛋白 CaM 具有非常高的保守性。该基因与中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*, KJ577632.1) 和果蝇 (*Drosophila melanogaster*, ACT88125.1) 的 CaM 氨基酸序列同源性高达 100%。与凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*, AEK21539.1)、克氏原螯虾 (*Procambarus clarkia*, ACI15835.1) 和仿刺参 (*Apostichopus japonicus* Swiss-Prot: P21251.2) 钙调蛋白同源性高达 99%。与拟镖剑水蚤 (*Paracyclops nana*, AII16520.1) CaM 同源性也达到 98% (图 4)。

使用 MEGA6.0 软件对系统进化进行分析, 并构建系统进化树 (图 5)。从系统进化树中可以看出,

10 个物种聚为两大类群, 三疣梭子蟹与凡纳滨对虾、中华绒螯蟹和克氏原螯虾紧密聚为一支, 之后与拟镖剑水蚤和旋毛虫的聚类关系较近, 与果蝇和长牡蛎的聚类亲缘关系较远。

2.5 PTCaM 基因的表达分析

2.5.1 PTCaM 基因在不同蜕皮时期中各个组织的表达情况 采用实时定量的方法对三疣梭子蟹不同蜕皮时期的各个组织 *PTCaM* 基因的表达情况进行定量 (图 6)。结果显示, 蜕皮后期的眼柄和鳃中, *PTCaM* 基因的表达量明显低于蜕皮前期和蜕皮间期, 差异显著 ($P < 0.05$)。血细胞、肌肉和心脏中 *PTCaM* 基因的表达量在蜕皮前期升高, 在蜕皮间期和蜕皮后期并无明显的变化 ($P > 0.05$)。肝胰腺中 *PTCaM* 基因的表达量在蜕皮各个时期中没有显著的变化, 整体呈现出在蜕皮前期表达量升高, 在蜕皮后期表达量降低的趋势。

2.5.2 PTCaM 基因在去除单侧眼柄和对照组的各个组织中的表达情况 对去除单侧眼柄的三疣梭子蟹不同蜕皮时期与相应的正常蜕皮时期的各个组织进行相对定量分析 (图 7, 图 8, 图 9)。结果显示, 去除单侧眼柄后的蜕皮间期和蜕皮前期的各个组织中, 与相应正常情况下对比, 表达均呈现下调; 而蜕皮后期, 各个组织整体出现表达上调的趋势, 只有血细胞中出现下调。

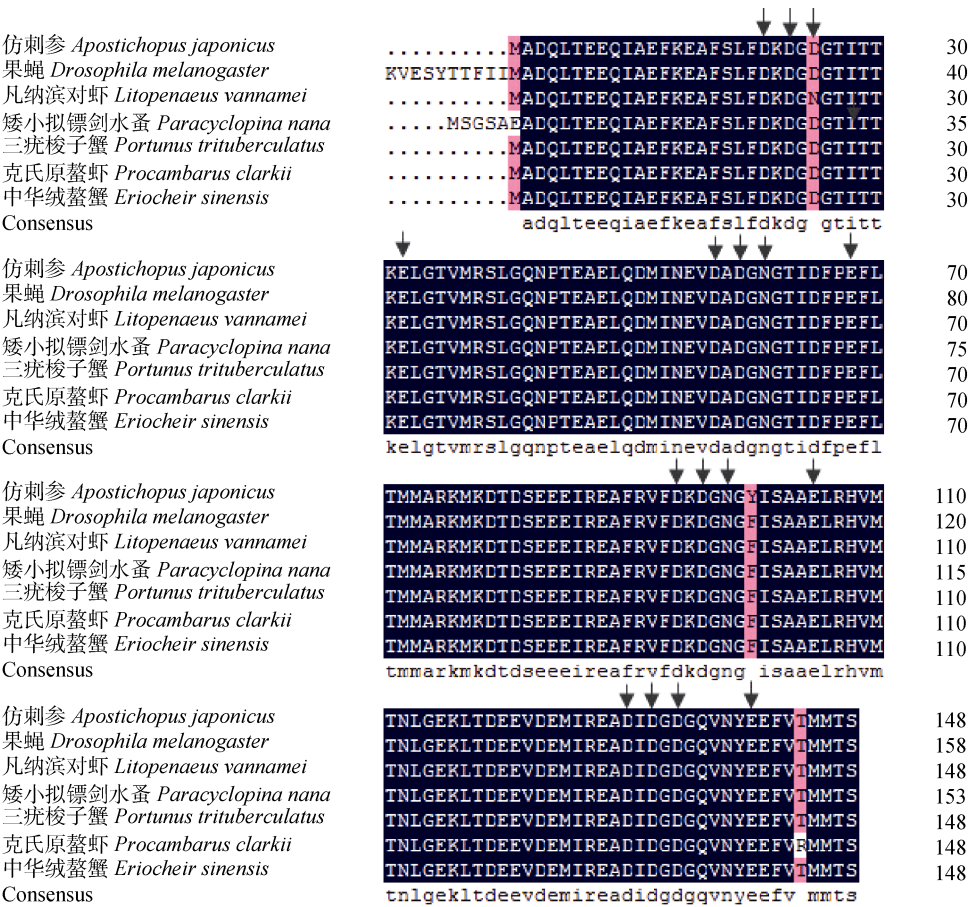


图 4 三疣梭子蟹 CaM 氨基酸序列与其他物种 CaM 氨基酸序列比对
箭头所指为 4 个 Ca^{2+} 结合位点(DDD-E/DDN-E).

Fig. 4 The amino acid sequences alignment of PTCaM and other species' CaM
Arrows point the site of Ca^{2+} combining (DDD-E/DDN-E).

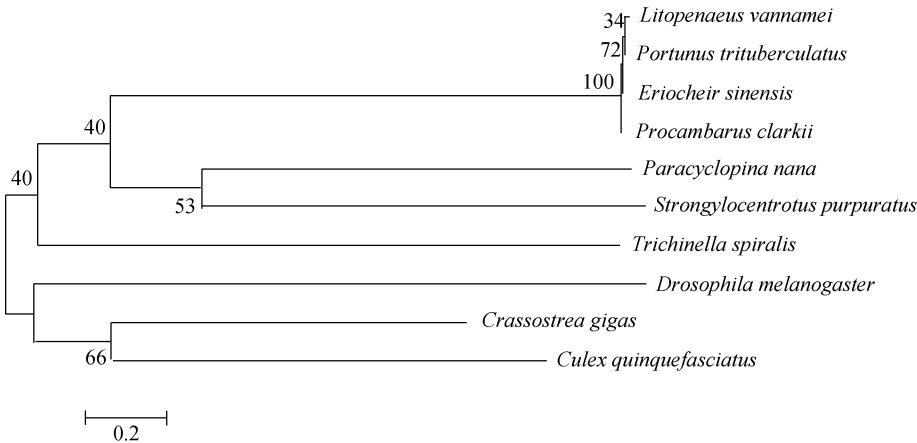


图 5 MEGA 6.0 软件采用邻接法构建的 PTCaM 氨基酸序列与其他物种 CaM 氨基酸序列的系统进化树
分叉处数值表示 1000 次重复抽样所得到的置信度, 只显示置信度>80%的数值; 标尺长度代表每个位点发生 0.2 次置换。

Fig. 5 NJ phylogenetic tree of amino acid sequences of *Portunus trituberculatus* and other species made by MEGA 6.0
The value at the forks indicate the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping the data (1000 replicates; shown only when confidence coefficient >80%). The length of the scaleplate stands for it occurred substitution at 0.2 turn.

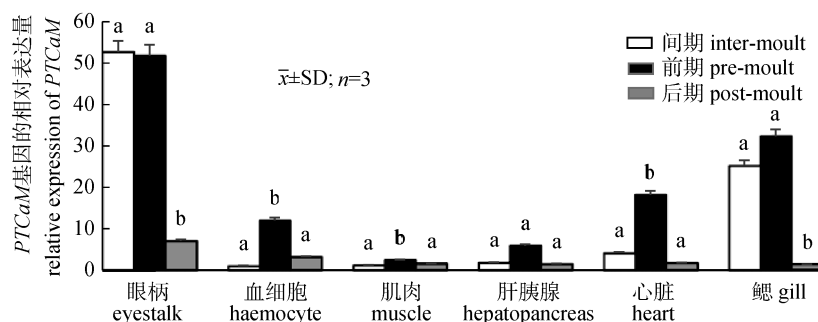


图 6 *PTCaM* 基因在三疣梭子蟹不同蜕皮时期的各个组织中的相对表达情况
同一组织内, 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$).

Fig. 6 Distribution of *PTCaM* gene expression in different tissues of different moult stages
Different letters indicate extremely significant differences ($P < 0.05$); same letters indicate non-significant differences ($P > 0.05$).

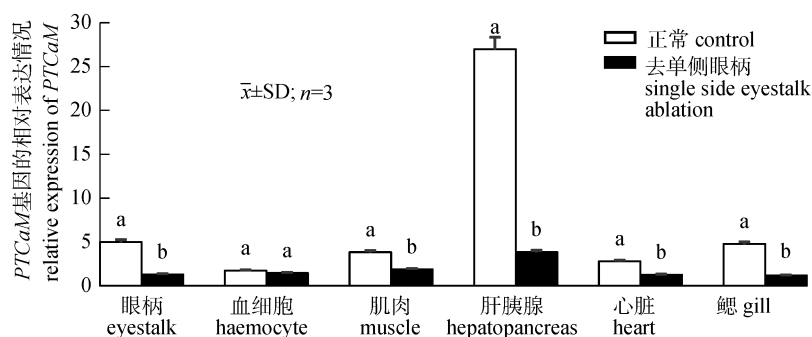


图 7 去除单侧眼柄的三疣梭子蟹与对照蜕皮间期 *PTCaM* 基因在各个组织中的相对表达情况

Fig. 7 Distribution of *PTCaM* gene expression in different tissues of the inter-moult stage in *Portunus trituberculatus* after single eye-ablation compared to the control

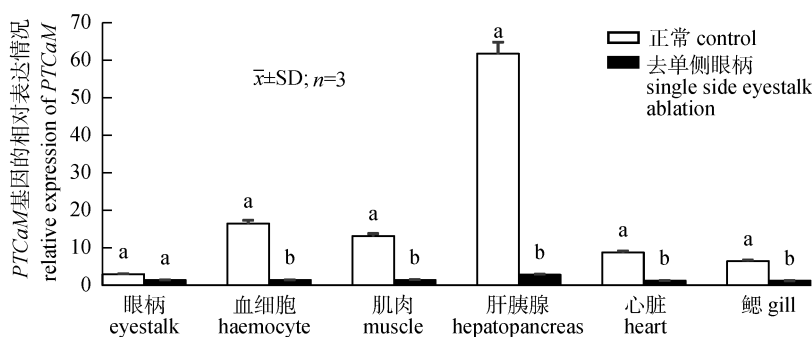


图 8 去除单侧眼柄的三疣梭子蟹与对照组蜕皮前期 *PTCaM* 基因在各个组织中的相对表达情况

Fig. 8 Distribution of *PTCaM* gene expression in different tissues of the pre-moult stage in *Portunus trituberculatus* after single eye-ablation compared to the control

3 讨论

本实验首次克隆了三疣梭子蟹的钙调蛋白基因, 全长 1981 bp, 其中开放阅读框长 450 bp, 编码 149 个氨基酸。该氨基酸序列非常保守, 研究

证明在脊椎动物中 CaM 氨基酸水平完全一致^[14]。在本研究的氨基酸序列比对中, *PTCaM* 基因编码的氨基酸与果蝇和中华绒螯蟹的 CaM 氨基酸序列覆盖率达 100%, 与凡纳滨对虾、克氏原螯虾和仿刺参覆盖率达 99%, 说明在节肢动物门中,

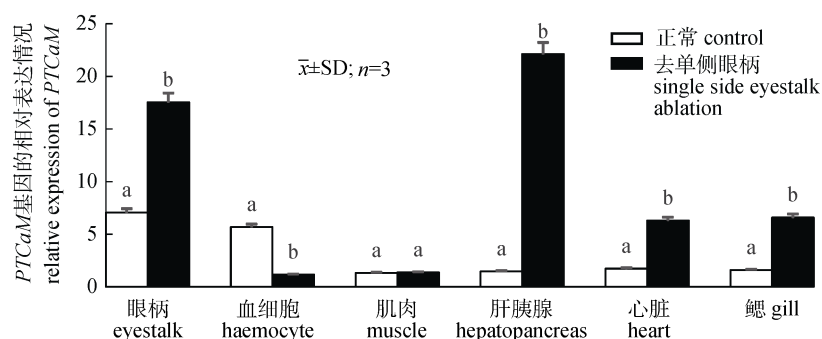


图 9 去除单侧眼柄的三疣梭子蟹与对照组蜕皮后期 *PTCaM* 基因在各个组织中的相对表达情况

Fig. 9 Distribution of *PTCaM* gene expression in different tissues of the post-moult stage in *Portunus trituberculatus* after single eye-ablation compared to the control

CaM 的氨基酸序列的差别极其微小。进化上的保守性也能说明钙调蛋白在功能上有着非同一般的重要作用。*PTCaM* 二级结构的预测显示, α 螺旋占 63.09%, 在三疣梭子蟹上证明了“钙调蛋白具有高度的 α 螺旋”这一结论。三级结构预测显示, *PTCaM* 具有钙离子配基, 说明了其与 Ca^{2+} 的紧密相关性。*PTCaM* 属于 EFh 超基因家族, 该家族特殊的结构域为具有 2 个 EF-hand 结构, EF-hand 结构是 Ca^{2+} 的结合区, 每个 EF-hand 具有 2 个 Ca^{2+} 结合域, 各可以结合 1 个 Ca^{2+} [15-16]。现今的研究也发现, EF-hand 通常成对出现, 并形成一分离的区域。因此该家族的蛋白结构有 2 个、4 个或 6 个 EF-hand, 成对的 EF-hand 之间可以相互沟通, EF-hand 之间的相互作用也显示出正向协同效应 [17]。该基因具有 4 个 EF-hand, 说明 *PTCaM* 基因属于 EFh 家族, 并证明了 EF-hand 成对出现的结论。

通过对不同蜕皮时期的各个组织中 *PTCaM* 基因的实时定量对比, 了解到该基因在三疣梭子蟹蜕皮过程的各个组织中, 均出现差异表达, 充分说明了 *PTCaM* 基因参与到蜕皮调控中并在各个组织都具有调控作用。其中眼柄和鳃中的差异表达最为显著, 为蜕皮后期表达量明显降低。推测主要原因为, 在蜕皮间期和蜕皮前期, 蟹为蜕皮做准备, 眼柄中活化后的 CaM 影响的酶较多, 参与的调控反应也较多, 同时鳃中 Ca^{2+} 的吸收作用相对于蜕皮后期也较多。其次是心脏、血细胞和肌肉, 呈现为蜕皮前期表达量较高。预测在临近蜕皮期间, 这 3 个组织中由于钙离子的重吸收

作用, 离子的转运强度加大, 能量代谢加大, 造成表达量较高。肝胰腺中的 *PTCaM* 表达结果经 SPSS 17.0 软件分析结果为差异不显著。三疣梭子蟹的肝胰腺具有吸收和储存营养、分泌消化酶等, 在蜕皮时期肝胰腺可将储存的脂质转移到其他组织, 保证能量供给 [18-21]。因此推测肝胰腺中, 该基因一直处于相对稳定且较为活跃的表达状态。*PTCaM* 在蜕皮时期各个组织中的整体表达趋势为: 在蜕皮前期表达量上升, 在蜕皮后期表达量下降。这与 Chen 等 [22] 对 Ca^{2+} 在蜕皮时期的变化水平研究结果相一致, 说明了钙调蛋白在三疣梭子蟹蜕皮周期中, 对 Ca^{2+} 的调节具有十分重要的作用。

去除单侧眼柄后, 对不同蜕皮时期的三疣梭子蟹与相对应的正常蜕皮时期的各个组织中 *PTCaM* 进行表达定量分析。结果显示, 去除单侧眼柄后, *PTCaM* 在蜕皮间期和蜕皮前期相对于对照组表达下调。由于蜕皮激素对甲壳类的蜕皮过程起着至关重要的作用 [23-24], 而眼柄中的窦腺复合体分泌的蜕皮抑制激素 (MIH) 和蜕皮激素 (Ecdysone) 存在着反馈抑制调节作用 [25-27], 去除眼柄能够造成 MIH 分泌的降低和蜕皮激素分泌的增加 [28]。因此推测, 眼柄神经肽类激素分泌的降低或者蜕皮激素的上升将会影响 *PTCaM* 基因的表达, 预测三疣梭子蟹 *CaM* 基因在蜕皮过程中与 MIH 或者蜕皮激素具有一定的相互作用。而在蜕皮后期, 去除单侧眼柄后与对照组相比, *PTCaM* 基因整体呈现上调趋势, 推测是因为去除

单侧眼柄的缘故, 导致 Ca^{2+} 的再利用与生物矿化过程更依赖于 *PTCaM* 的调控作用。具体的作用机理还有待于进一步研究。

本研究首次克隆出三疣梭子蟹 *PTCaM* 基因的全长 cDNA 序列, 氨基酸序列分析结果证明了钙调蛋白的保守性。通过对不同蜕皮时期各个组织中该基因的实时定量, 证实了 *PTCaM* 基因参与蜕皮调控过程, 为钙调蛋白的研究提供了新的信息。有关 *PTCaM* 基因的作用机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Gao B Q, Liu P, Li J, et al. Isozyme polymorphism in *Portunus trituberculatus* from wild population[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(1): 1–6. [高保全, 刘萍, 李建, 等. 三疣梭子蟹野生群体同工酶的遗传多态性分析[J]. 水产学报, 2007, 31(1): 1–6.]
- [2] Chinese Fishery Statistical Yearbook: 2013[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013: 91–93. [中国渔业统计年鉴: 2013[M]. 中国农业出版社, 2013: 91–93.]
- [3] Xu Y H. The structure and function of calmodulin(A)[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1985(1): 22–27. [徐友涵. 钙调蛋白的结构与功能(上)[J]. 生物化学与生物物理进展, 1985(1): 22–27.]
- [4] Dagher R, Brière C, Fève M, et al. Calcium fingerprints induced by Calmodulin interactors in eukaryotic cells[J]. Biochim Biophys Acta–Mol Cell Res, 2009, 1793(6): 1068–1077.
- [5] Haiech J, Moulhaye S B M, Kilhoffer M C. The EF-Handome: combining comparative genomic study using FamDBtool, a new bioinformatics tool, and the network of expertise of the European Calcium Society[J]. Biochim Biophys Acta–Mol Cell Res, 2004, 1742(1–3): 179–183.
- [6] Means A R, Dedman J R. Calmodulin—an intracellular calcium receptor[J]. Nature, 1980, 285: 73–77.
- [7] Eldik L J V, Watterson D M. Calmodulin structure and function[M]//Marmé D. Calcium and Cell Physiology. Springer Berlin Heidelberg, 1985: 105–126.
- [8] Zühlke R D, Pitt G S, Deisseroth K, et al. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels[J]. Nature, 1999, 399: 159–162.
- [9] Arnon A, Cook B, Montell C, et al. Calmodulin regulation of calcium stores in phototransduction of *Drosophila*[J]. Science, 1997, 275(5303): 1119–1121.
- [10] Stommel E W, Stephens R E, Masure H R, et al. Specific localization of scallop gill epithelial calmodulin in cilia[J]. J Cell Biol, 1982, 92(3): 622–628.
- [11] Chen H Y, Watson R D. Changes in intracellular calcium concentration in crustacean (*Callinectes sapidus*) Y-organs: relation to the hemolymphatic ecdysteroid titer[J]. J Exp Zool Part A, 2011, 315A(1): 56–60.
- [12] Gao Y P, Gillen C M, Wheatly M G. Cloning and characterization of a calmodulin gene (CaM) in crayfish *Procambarus clarkii* and expression during molting[J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2009, 152(3): 216–225.
- [13] Shen J, Zhu D F, Hu Z H, et al. Molt staging in the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(10): 1481–1487. [沈洁, 朱冬发, 胡则辉, 等. 三疣梭子蟹蜕皮周期的分期[J]. 水产学报, 2011, 35(10): 1481–1487.]
- [14] Yuasa H J, Suzuki T, Yazawa M. Structural organization of lower marine nonvertebrate calmodulin genes[J]. Gene, 2001, 279(2): 205–212.
- [15] Gomez T M, Spitzer N C. Regulation of growth cone behavior by calcium: New dynamics to earlier perspectives[J]. J Neurobiol, 2000, 44(2): 174–183.
- [16] Zheng J Q. Turning of nerve growth cones induced by localized increases in intracellular calcium ions[J]. Nature, 2000, 403: 89–93.
- [17] 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: 199–221.
- [18] Jiang H, Yin Y X, Zhang X W, et al. Chasing relationships between nutrition and reproduction: A comparative transcriptome analysis of hepatopancreas and testis from *Eriocheir sinensis*[J]. Comp Biochem Physiol D: Genomics Proteomics, 2009, 4(3): 227–234.
- [19] Wen X B, Chen L Q, Ai C X, et al. Variation in lipid composition of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* during ovarian maturation[J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2001, 130(1): 95–104.
- [20] Vogt G. Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda)[J]. Zoomorphology, 1994, 114(2): 83–101.
- [21] Yao G G, Wu X G, Cheng Y X, et al. The changes of histology and main biochemical composition in the hepatopancreas at the different physiological stages of *Portunus trituberculatus* in East China Sea[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2008, 30(6): 122–131. [姚桂桂, 吴旭干, 成永旭, 等. 东海三疣梭子蟹雌体不同生理阶段肝胰腺的生化组成与其组织学结构的关系[J]. 海洋学报, 2008, 30(6): 122–131.]
- [22] Chen H Y, Dillaman R M, Roer R D, et al. Stage-specific changes in calcium concentration in crustacean (*Callinectes*

- sapidus*) Y-organs during a natural molting cycle, and their relation to the hemolymphatic ecdysteroid titer[J]. *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol*, 2012, 163(1): 170–173.
- [23] Yao J J, Zhao Y L. The progress on Crustaceans molting of regulating mechanism [J]. *Reservoir Fisheries*, 2006, 26(6): 8–10. [姚俊杰, 赵云龙. 甲壳动物蜕皮的调节机制研究进展[J]. *水利渔业*, 2006, 26(6): 8–10.]
- [24] Qian Z Y, He S L, Liu T, et al. Identification of ecdysteroid signaling late-response genes from different tissues of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol*, 2014, 172: 10–30.
- [25] Song X, Zhou K Y. Development of neurohormones in the eyestalk of Crustacea[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2000, 35(4): 39–43. [宋霞, 周开亚. 甲壳类的眼柄神经激素[J]. *动物学杂志*, 2000, 35(4): 39–43.]
- [26] Nakatsuji T, Lee C Y, Watson R D. Crustacean molt-inhibiting hormone: Structure, function, and cellular mode of action[J]. *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol*, 2009, 152(2): 139–148.
- [27] Chung J S, Webster S G. Moulting cycle-related changes in biological activity of moult-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, *Carcinus maenas*[J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270(15): 3280–3288.
- [28] Uawisetwathana U, Leelatanawit R, Klanchui A, et al. Insights into eyestalk ablation mechanism to induce ovarian maturation in the black tiger shrimp[J]. *PloS ONE*, 2011, 6(9): e24427.

Cloning and expression analysis of *Portunus trituberculatus* calmodulin cDNA

ZHANG Longtao^{1,2}, LÜ Jianjian¹, GAO Baoquan¹, LIU Ping¹

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: *Portunus trituberculatus* is the primary marine crab species cultured in China. Molting is vital for growth, reproduction, and regeneration in crustaceans. Molting is regulated by a complex molecular mechanism but the details remain unclear and require further research. Calmodulin (CaM) is a conserved multifunctional protein that regulates Ca^{2+} and glycogen metabolism, influences cell division and movement, and is involved with neurotransmitter synthesis and release. Cloning and cloning a CaM gene to investigate the functions and roles of CaM during molting depends on the transcriptome data. *P. trituberculatus* CaM cDNA was cloned using rapid amplification of cDNA ends and named *PTCaM*. The *PTCaM* full-length cDNA was 1981 bp, including a 450-bp open reading frame that encoded a 256 amino acid polypeptide, with a molecular mass of 16.8 kD and an isoelectric point of 4.09. A bioinformatics analysis revealed that *PTCaM* has a highly conserved sequence with a typical Ca^{2+} EF-hand binding domain of the EF superfamily. The EF-hand is a calcium binding motif with two active canonical EF hands. Ca^{2+} binding induces a conformational change in the EF-hand motif leading to activation or inactivation of target proteins. A homology analysis showed that *PTCaM* had the highest homology with *Eriocheir sinensis* and *Drosophila melanogaster*. A phylogenetic analysis showed that *PTCaM* was in the same branch with *Litopenaeus vannamei*, *E. sinensis*, and *Procambarus clarkia*. A real-time quantitative polymerase chain reaction analysis of different molting stages showed that *PTCaM* was expressed significantly differently in all tissues tested during molting, which reveals a molting function for *PTCaM*. *PTCaM* expression in the eyestalk and gill were downregulated during the post-molt stage, suggesting that *PTCaM* may participate in preparation for molting. *PTCaM* expression was upregulated in heart, hemocytes, and muscle during the pre-molt stage, suggesting that *PTCaM* may regulate ion transport, particularly that of Ca^{2+} . *PTCaM* expression was downregulated in most tissues after eyestalk ablation, compared to that in normal control tissues. *PTCaM* may cooperate with molt inhibiting hormone or ecdysone because single-eyestalk ablation has less of an inhibiting effect on ecdysone synthesis.

Key words: *Portunus trituberculatus*; calmodulin; gene cloning; sequence expression; eyestalk-ablated

Corresponding author: LIU Ping. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn