

## 瘤背石磺磷脂酶C基因的克隆及在不同声波刺激下的表达

杨铁柱, 饶榕城, 黄笑含, 吴容宇, 贾晶晶, 沈和定

### Cloning and expression of the phospholipase C gene in *Onchidium reevesii* under different frequency sound wave stimulation

YANG Tiezhu, RAO Rongcheng, HUANG Xiaohan, WU Rongyu, JIA Jingjing, SHEN Heding

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20200803152>

#### 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

#### 瘤背石磺产卵规律与天文潮汐关系

The relationship between *Onchidium struma*'s spawning regularity and astronomical tides

上海海洋大学学报. 2018, 27(1): 73 <https://doi.org/10.12024/jsou.20170201961>

#### 三角帆蚌中WNT4基因克隆及表达分析

Cloning and expression analysis of *WNT4* gene in the *Hyriopsis cumingii*

上海海洋大学学报. 2020, 29(6): 801 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191202894>

#### 尼罗罗非鱼TIRAP基因克隆、组织表达及其在无乳链球菌、脂多糖和聚肌胞苷酸刺激下的免疫应答

Cloning and expression of *TIRAP* gene and immune response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*, lipopolysaccharides and polyinosinic polycytidylic acid stress

上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 857 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-318>

#### 暗纹东方sox9基因的克隆和组织表达分析

Molecular cloning and tissue expression analysis of *sox9* gene in *Takifugu obscurus*

上海海洋大学学报. 2019, 28(6): 835 <https://doi.org/10.12024/jsou.20181202462>

#### 克氏原螯虾泛素结合酶E2基因的克隆及其在卵巢中的表达分析

Cloning and expression analysis of ubiquitin-conjugating enzyme E2 gene of *Procambarus clarkii*

上海海洋大学学报. 2018, 27(6): 814 <https://doi.org/10.12024/jsou.20180402288>

## 瘤背石磺磷脂酶 C 基因的克隆及在不同声波刺激下的表达

杨铁柱<sup>1,2</sup>, 饶榕城<sup>1</sup>, 黄笑含<sup>1</sup>, 吴容宇<sup>1</sup>, 贾晶晶<sup>1</sup>, 沈和定<sup>1,3</sup>

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 2. 信阳农林学院水产学院 河南省渔业生物工程  
技术研究中心, 河南 信阳 464000; 3. 上海海洋大学 海洋动物系统分类与进化上海高校重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 磷脂酶 C (Phospholipase C, PLC) 是一类与膜蛋白相关的酶, 在信号转导途径中起作用。栖息于潮间带的瘤背石磺 (*Onchidium reevesii*) 能够感知当地的潮汐规律, 为了探究瘤背石磺中磷脂酶 C 在潮汐感知中的作用和分子机制, 本实验以瘤背石磺神经环为实验材料, 利用 RACE-PCR 技术得到了其 cDNA 全长, 并进行生物信息学分析和实时荧光定量 PCR 实验。结果显示, 瘤背石磺 PLC 基因的 cDNA 全长为 2 578 bp, 开放阅读框 1 881 bp, 5' 非编码区 337 bp, 3' 非编码区 340 bp, 并且在末端存在 AATAAA 加尾信号, 共编码 627 个氨基酸; 氨基酸序列比对结果显示, 瘤背石磺 PLC 氨基酸序列与福寿螺的磷脂酶 C 样蛋白 2 氨基酸序列匹配度最高, 与传统形态学的分类相吻合。在实验室内模拟潮汐产生的声波来刺激瘤背石磺, 使用实时荧光定量 PCR 检测 *OrPLC* 基因在瘤背石磺神经环中的表达, 结果显示: *OrPLC* 在刺激声波频率为 40 Hz 和 70 Hz 的时候表达量基本稳定; 声波频率为 160 Hz 和 310 Hz 时表达量较低; 在声波频率为 220 Hz 和 280 Hz 时, 处于高表达的状态, 说明该基因在瘤背石磺的低频感知中发挥重要作用。该实验为进一步了解瘤背石磺潮汐感知功能研究奠定了理论支撑。

**关键词:** 瘤背石磺; 磷脂酶 C; 低频声波; 潮汐节律; 基因表达

**中图分类号:** S 917 **文献标志码:** A

瘤背石磺 (*Onchidium reevesii*) 隶属于软体动物门 (Mollusca) 腹足纲 (Gastropoda) 肺螺亚纲 (Pulmonata) 柄眼目 (Stylommatophora) 石磺科 (Onchidiidae)<sup>[1]</sup>, 在中国主要分布在江苏、上海、浙江等沿海地区<sup>[2]</sup>。相对于加州海兔 (*Aplysia californica*), 瘤背石磺在我国更加容易获得, 并且其中枢神经结构简单, 容易分离, 是进行神经功能研究的良好素材<sup>[3]</sup>。

生活在潮间带的生物, 由于潮水的涨落, 往往会形成特有的潮汐节律, 如帽贝 (*Patella caerulea*)<sup>[4]</sup> 和红树林蟋蟀 (*Apteronemobius asahinai*)<sup>[5]</sup>。同样生活在潮间带的瘤背石磺, 能够在涨潮前及时进入潮上带洞穴中或者爬至芦苇枝上躲避海水, 这种能够感知潮汐及时归穴的行为早在 100 多年前就已经被报道<sup>[6]</sup>, 刘杰等<sup>[7]</sup>报道了瘤背石磺其产卵规律趋势、产卵周期与潮高相关。在实验室长期投饵暂养后的瘤背石磺

仍能记忆潮汐期, 对潮汐有节律性, 能记住当地的潮汐规律, 具有潮汐记忆和感知能力。

海洋环境产生的声音对海洋动物的行为、生理等都有影响<sup>[8]</sup>。SOLÉ 等<sup>[9]</sup>发现水下的噪声会破坏水母 (*Cotylorhiza tuberculata* 和 *Rhizostoma pulmo*) 的平衡囊结构, 导致水母的听力产生损伤, KAIFU 等<sup>[10]</sup>发现章鱼 (*Octopus ocellatus*) 利用平衡囊感知水下声音, 梁威等<sup>[11]</sup>发现外界的声波对瘤背石磺的钙调素蛋白和类钙调素蛋白表达产生影响。瘤背石磺潜在的对外界声波的感知功能可能是瘤背石磺进行潮汐感知的关键。

磷脂酶 C (Phospholipase C, PLC) 是一类与膜蛋白相关的酶, 可在磷酸二酯键甘油侧选择性催化磷脂酰肌醇 4,5 双磷酸酯 (PIP<sub>2</sub>) 的水解, 产生二酰基甘油 (DAG) 和肌醇 1,4,5-三磷酸 (IP<sub>3</sub>) 两个第二信使, IP<sub>3</sub> 与内质网外膜上的 Ca<sup>2+</sup> 通道结合后释放 Ca<sup>2+</sup> 进入胞浆, 胞浆内 Ca<sup>2+</sup> 浓度增加

收稿日期: 2020-08-19 修回日期: 2021-04-21

基金项目: 国家自然科学基金(41276157)

作者简介: 杨铁柱(1990—), 男, 硕士研究生, 研究方向为海洋贝类功能基因。E-mail: yangtiezhu1234@163.com

通信作者: 沈和定, E-mail: hdshen@shou.edu.cn

使  $\text{Ca}^{2+}$  与细胞内钙调蛋白 (CAM) 结合, 激活蛋白激酶, 促进蛋白质酶磷酸化, 从而发挥信号传导的功能<sup>[12-14]</sup>。PENG 等<sup>[15]</sup> 发现人类噪声对缙蛭 (*Sinonovacula constricta*)  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 的活性产生影响, 从而导致其下潜行为产生变化, WONG 等<sup>[16]</sup> 发现在小鼠的耳蜗毛细胞中  $\text{Ca}^{2+}$  对声音的传导和听觉的神经传递起作用。在瘤背石磺中, 钙调蛋白的相关基因已经有了报道<sup>[17-18]</sup>, 而 PLC 作为一种可以调控钙调蛋白的酶, 推测其在瘤背石磺的低频感知中可能起到作用。

本实验通过瘤背石磺神经转录组, 利用 RACE-PCR 技术获得瘤背石磺的 PLC 基因的 cDNA 全长, 利用荧光定量 PCR 技术检测不同频率刺激对瘤背石磺 PLC 基因的表达情况, 为今后深入研究瘤背石磺潮汐感知功能奠定科学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与样品处理

瘤背石磺采集于上海市崇明岛滩涂区的芦苇丛中, 选择质量为  $(30 \pm 2)$  g、体长为  $(7.0 \pm 0.5)$  cm 的 400 只瘤背石磺置于若干个塑料培养箱暂养, 塑料培养箱斜倾并放扁平砖块, 在倾斜的低端加水, 模拟海边的环境, 暂养期间每天晚上投喂玉米粉并且清理粪便, 如果有个体死亡及时清除, 保持塑料培养箱的低端有水, 维持塑料培养箱的土壤处于湿润的状态。

将暂养 2 周以上的瘤背石磺分别放置到声波频率为 0 (对照组)、10、40、70、100、130、160、190、220、250、280 和 310 Hz 的处理条件下, 连续刺激 0、0.5、1、2、4、8、12 和 24 h 后取样。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 瘤背石磺神经环总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

每个处理选取 3 只瘤背石磺成体, 取其神经环, 将剪取的神经环放置到一个冻存管中, 并立即放置到液氮中进行保存备用, 或者立即进行 RNA 的提取。在超净工作台中使用 TaKaRa 公司生产的 RNAiso Plus 试剂, 按照说明书的标准

流程进行瘤背石磺神经环 RNA 的提取。实验过程中, 试剂与样品放置到冰盒上, 确保提取 RNA 的完整性。使用 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, 美国) 检测提取的总 RNA 浓度和核酸吸收峰, 使用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测提取的 RNA 完整性。使用南京诺唯赞生物公司的 HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 产品试剂盒, 以 RNA 模板量为 1 000 ng 的统一标准, 按照该试剂盒说明书进行操作, 反转录成 cDNA。

#### 1.2.2 瘤背石磺 *OrPLC* 基因的全长转录本克隆与生物信息学分析

在瘤背石磺神经环 PacBio 转录组数据中, 筛选出 *PLC* 基因的转录本 (cb16156\_c767/f3p0/2572), 并将其在本转录本中的片段命名为 *OrPLC* (GenBank 登录号 MT862760)。使用 Primer premier 5.0 工具软件设计特异性引物 (表 1) 验证本序列的准确性。PCR 反应体系为 50  $\mu\text{L}$ :  $2 \times \text{Taq}$  Master Mix 25  $\mu\text{L}$  (TaKaRa, 上海), 上下游引物各 1.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 20  $\mu\text{L}$ , cDNA 2  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  60 s, 38 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

*OrPLC* 基因 cDNA 全长 5' 端和 3' 端的克隆采用 RACE (rapid-amplification of cDNA ends) 技术, 按照 SMARTER<sup>®</sup> RACE5'/3' Kit User Manual (TaKaRa, Japan) 进行, 克隆过程中所用的引物见表 1。割胶回收试剂盒 (天根生化科技北京有限公司) 回收目的条带, 连接到 pGEM-T vector (Promega, 美国), 反应体系: PCR 反应产物 1  $\mu\text{L}$ , T4 DNA Ligase 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 2  $\mu\text{L}$ 。16  $^{\circ}\text{C}$  孵育后转化到感受态 DH5 $\alpha$  大肠杆菌细胞 (天根生化科技北京有限公司) 后, 涂布于含有氨苄的选择性培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 16 ~ 24 h, LB 平板蓝白斑筛选阳性克隆, 挑取出白斑菌落, 进行菌液 PCR 反应检测, 随后挑取目的菌液送生工生物工程 (上海) 有限公司测序。测序成功的序列利用 DNAMAN 软件进行拼接, 获得 *OrPLC* 基因的 cDNA 全长。

表 1 基因片段验证及 RACE PCR 克隆中所用到的引物序列  
Tab. 1 Primer sequences used in gene fragment verification and RACE PCR

引物名 Primers	引物序列(5'-3') Sequences (5' - 3')	引物用途 Usage	扩增片段 Fragments length/bp
<i>OrPLC</i> -1F	GGAAGAAGACGACGACGAA	验证序列的准确性	1 297
<i>OrPLC</i> -1R	AAAGGCGTTCTCGTTGAT		
<i>OrPLC</i> -2F	ACCCGCTCAGTCACTACTTC	验证序列的准确性	1 306
<i>OrPLC</i> -2R	AATTCCTCGTTGGATGCTG		
<i>OrPLC</i> -5'outer	CCTGGACACCTTGACACCGAC	5'RACE 特异性引物	2 000
<i>OrPLC</i> -5'inner	AGGACAGGGCATAAATGGGATTGC		1 946
<i>OrPLC</i> -3'outer	AGGACCTGTGGAAGTGTGGCT	3'RACE 特异性引物	1 979
<i>OrPLC</i> -3'inner	ACTTCCATCCCCGAGTTTT		1 587

将组装之后获得的 *OrPLC* 基因的 cDNA 序列,使用 NCBI 在线工具 orfFinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测转录本基因的开放阅读框;使用 SMART 在线分析网站 (<http://smart.emblheidelberg.de/>) 预测转录本所翻译的蛋白质功能结构域;使用 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>) 预测所翻译氨基酸序列的二级结构;使用 SwissPdb Viewer 软件分析所翻译的氨基酸序列的蛋白质三级结构;使用 DNAMAN 软件对氨基酸序列进行同源性序列比对,MEGA 6.0 和 MrBayes 软件构建系统发育进化树。

### 1.2.3 *OrPLC* 基因的荧光定量

根据已获得的 *OrPLC* 的转录本序列在其

CDS 区域设计 qRT-PCR 特异性引物,依据转录组数据,从中选择常作为内参基因的转录本。本次实验所使用的内参基因为 18S rRNA<sup>[19]</sup>。使用诺唯赞生物公司的产品 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 对 1.1 节中的不同样本进行荧光定量 PCR 检测,每个样品进行 3 次重复,使用的定量检测仪器为 ABIQ6 荧光定量 PCR 仪 (Thermo Fisher, 美国)。PCR 的总反应体系采用说明书推荐的 20  $\mu$ L 体系:2  $\times$  ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10  $\mu$ L,上下游引物各 0.4  $\mu$ L,cDNA 模板 1.5  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 7.7  $\mu$ L;按照说明书推荐的流程条件进行检测,使用的引物序列如表 2 所示。

表 2 实时荧光定量 PCR 实验所用的特异性引物  
Tab. 2 Specific primers for qRT-PCR experiments

引物名称 Primers	引物序列(5'-3') Sequences(5' - 3')	用途 Usage
RT- <i>OrPLC</i> -F	CAGGAGGACAGCAACGGAA	<i>OrPLC</i> 定量引物
RT- <i>OrPLC</i> -R	GTGGCCACTTGCATCAGCTC	
RT-18S rRNA-F	CGGCTACCACATCCAAGGAA	内参基因定量引物
RT-18S rRNA-R	GCTGGAATTACCGCGCT	

### 1.3 数据处理与分析

对 1.2.3 节得到的数据采用相对定量算法 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup> 法<sup>[20]</sup>计算 *OrPLC* 基因的相对表达量;使用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析 (One-way ANOVA),采用 Turkey 法进行差异显著性分析, $P < 0.05$  表示具有显著性差异;使用 Rstudio 作图。

## 2 结果

### 2.1 *OrPLC* 的序列分析

经过 DNAMAN 拼接后得到的 *OrPLC* 基因的

全长转录本序列长度为 2 578 bp,其中 ORF 框长度为 1 881 bp,共编码 627 个氨基酸,5' 端有 337 bp 的 UTR 区,3' 端有 340 bp 的 UTR 区,并且 3' 末端存在 AACAA 加尾信号 (图 1)。所编码的蛋白质的相对分子量 71.473 ku,理论等电点为 6.52,氨基酸链中占比最高的氨基酸为丝氨酸 (Ser,9.4%) 和亮氨酸 (Leu,9.1%)。二级结构预测结果显示,*OrPLC* 蛋白的二级结构以  $\alpha$  螺旋为主,占比达到了整个氨基酸序列的 34%。在预测结果中,*OrPLC* 氨基酸链中分别拥有磷脂酶 C 典型的 PH 和 EF hand 结构域。三级结构预测显

```

1          AGTCTAAGAAATGATCTGAAACATGGCGGACGAGGAGGAAAAACACAAATGGGATTGTA AAC
62 ACTATGGAGAATAAAGCAGAGGATGTGTTCTTAATGGGGATGAAAATGTTAATGTAGAAGTCTGTGAT
131 GAAGAAGATGAAGAAGAAGAGGAGGAAGAAGACGACGACGAATATGGAGTATGCAATTCGGATACCAAT
209 TCATCGGAACCCGTGTACCCCGGAGATCCAGTCTTATGAATAAGATAAGGATGGCAGCAGACGACCA
260 ATACGAAAGAAAACAGTTTCTTTAGCAGTATGCCAACGGAGAAAAAATCGCAACAGCCCAATAATGT
338 ATGGCCTACATGCAGAACGGCAGTGAAGTATTAGGTGCGCTCCAAACAGCCCGCAGTACCCCGTTTC
1      M A Y M Q N G S E L I K V R S N S R Q Y H R F
405 TTCTCACTCAGCAGTGTCTCCGAGATCAGGTGGCAGCCACATCTAAGAAACCCATAAGGCCTAGA
24      F S L S S D V S E I R W Q P T S K K P H K A R
474 ATTGCTGTCTCCATCAAGAAGTGGCGCAGGGCAAGACCAGGAGCGCTGAGGAGCAAAAGAGATC
47      I A V S S I K E V R Q G K T T E A L R S K E I
543 GTGGCGTCTACCCGGACGAATGCGCCTTCTCCATCATCTTTGGGGAGGAGTTCAGTCCATGGATTTG
70      V G V Y P D E C A F S I I F G E E F E S M D L
612 ATCGCAACACACCAGACGAGGCTAACATTTGGATTACGGGGCTGACCTGTCTGCTCAACGCAAACTCC
93      I A N T P D E A N I W I T G L T C L L N A N S
681 AAGTCCAGAACTCCACCAACGCCATGGAGACATGCAACGAATGAGAGATGCCTGGTTGTTGGAGCTG
116     K S R N S T N A I G D M Q R M R D A W L L E L
750 TTCCAGTCGGCCTCCCGGACGACGGCACCTGGAGGAGACGGAGTGGTCAGCCTGATGAAGAGAATC
139     F Q S A S P D D G T L E E T R V V S L M K R I
819 AACACCACATCACCACCTCCATCATCTGCCAGAAACTTAAGGAACTGGAGATGAAGCGTGGCGATGGC
162     N T T I T T S I I C Q K L K E L E M K R G D G
888 AAGCGAGGCCACTCAGCAGTGAAGAGTTTATATCGTTGTTCAAGGAGATCTCCACAGCCCTGAAATC
85      K R G R L S S E E F I S L F K E I S T R P E I
957 TATTTCTTCTCGTCAGGTATGCAAGCAACGGGACTACATGTCCACTGACACTGTACTGTTTCTG
208     Y F L L V R Y A S N A D Y M S T D D L L L F L
1 026 GAAGCTGAGCAAGGGATGCAAGAGTTACGAAAGACAAGTGTGTTGGAGATCATCACAAATTTGAACCA
231     E A E Q G M Q R V T K D K C L E I I N K F E P
1 095 ACGAAGGAGGCCGACGAAAGGACATCGGGCATTGACGTTTCACGGCCTATCTGCTCTCTGAAGAA
254     T K E G R R K G H L G I D G F T A Y L L S E E
1 164 TGTGACCTGTTCCGCCGAGCATCTCTGTGTGCCAGGACATGACGACCCCGCTCAGTCACTACTTC
277     C D L F D P E H L S V C Q D M T H P L S H Y F
1 233 ATCGCCAGCTCACACAACACATACTGTTAGAAGATCAGTTGAAGGGCCCTCCAGTGTGGACGGCTAC
300     I A S S H N T Y L L E D Q L K G P S S V D G Y
1 302 ATACGGGCGCTCAAGAGAGGCTGCGCTGTCTGGAATTGGACTGTTGGACGGCCCAATGACGAGCC
323     I R A L K R G C R C L E L D C W D G P N D G
1 371 ATCATCTACCAGGCCACACCTCACAATCAAGATCTCCTTCAAGGCTGTGATTGAAGCCATCAACGAG
346     I I Y H G H T L T S K I S F K A V I E A I N E
1 440 AACGCCTTACCTATTCAGAGTACCCTGTGATATTGTCATAGAGAACCCTGCAACGTCACCAACAG
369     N A F T Y S E Y P V I L S I E N H C N V K Q Q
1 509 CAAGCTATGGCCACTTCATCAAGTCTGTGCTGGGAGACAACTCTTCACTGACAACGTTGATCTCAGC
392     Q A M A H F I K S V L G D K L F T D N V D L S
1 578 CGGACCACACTTCCATCCCGCAGTTTTTCAAGGGCAAAATCCTCATCAAGGGTAAGAAGCTGCCTCTC
415     R T T L P S P Q F F K G K I L I K G K L L P L
1 647 AACTCTGAATCCAATGAAGCTACGTCACAGATGAGGATGAAGGGCAGAACCGGAGAAGAAAAAGAAC
438     N S E S N E G Y V T D E D E G A E P E K K K N
1 716 AGCAAAAGAGAGGGCTCTATCAAGAAACACAAGTTGGCCAAAGAGTTGTCGACCTGGTGTCTACTGT
461     S K R E G S I K K H K L A K E L S D L V S Y C
1 785 GTGTCGAAGAGATTGAGGAGTCCAGACATCTCAACAAAACAAAAAATCTGGGAAATCAACTCCTTC
484     V S K R F E E F Q T S Q Q N Q K Y W E I N S F
1 854 AGTGAATCTAAGCTCTGAAGTTGGCAATGTCTGTCTGAGGAGTTGTCAACCACAACAAGAAGTTC
507     S E S Q A L K L A M S C P E E F V N H N K K F
1 923 CTGTCCTGATTTACCTAACGGCATGCGAGTGGATTCCAGCAACTACAATCCTCAGGACCTGTGGAAC
530     L S R I Y P N G M R V D S S N Y N P Q D L W N
1 992 TGTGGCTGTACATGGTGGCCCTGAACATCAGACAGCGGCCTGATGATGGATCTCTATCAGGATGG
553     C G C H M V A L N Y Q T A G L M M D L Y H G W
2 061 TTCCAGAAAAATGGAGCCTGCGGATACATTTAAAGCCAGCCATCATGAGAGGAGATAGCCTATTTT
576     F Q K N G A C G Y I L K P A I M R E E I A Y F
2 130 AGCCCAACACTAGAGATGTGATACCTGGAGTTTACCCAGATTTTGCATGTCAAGGTAAGACTTGGC
599     S A N T R D V I P G V S P Q I L H V K V R L G
2 199 CACATTTCTCATGCAGTTGATGATTCAGGTGCTAGACAGGTCGTGATGAATATCTTCAAGCATTACC
622     H I F S C S *
2 268 TGTCTCTGACATTTAGTTCTCAACATAATTATATAAAAAATTTTAAATTCATGATGTTTGGAA
2 337 ATTTAGACTTAACGTGAAATGAAAATGTTCAAGAGATATTGCTCGTTAATCCTAATGATTTTCACTC
2 406 TTGGTTTTAGTTCGTCAAGTAAACAAGAGCTTGTTTGTGATGGTCTATTTTCCACCACCATCCACTT
2 475 TATTTGTTTCACTAAGGGCTGATTGCAGCATCAACGGGAATTTATCAACCGAAGGAATTTATAACA
2 544 TCTTGTTTATTGATAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

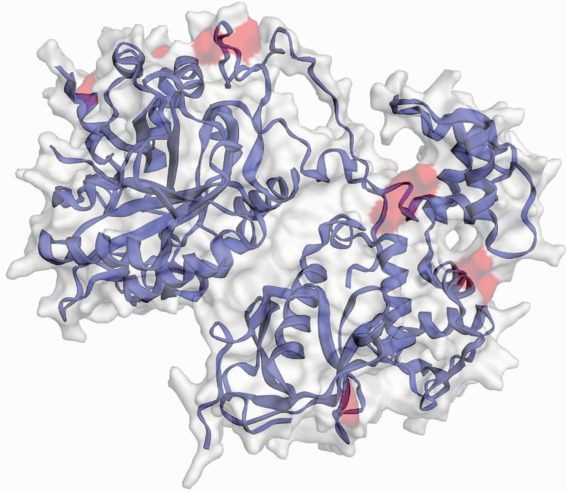
单下划线部分为 PH 超家族结构域,波浪线部分为 EF hand 结构域,方框内是加尾信号。

The single underlined part is the PH superfamily domain, the wave line part is the EF hand domain, and the square box part is the tail signal.

图 1 瘤背石磷 *OrPLC* 基因的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 *OrPLC* cDNA sequence and its encoded amino acid sequence

示 OrPLC 蛋白的三维结构为左右对称中间带有夹沟的构象(图 2);相邻两个  $\alpha$  螺旋的拐角位置为  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点(图 2 中的红色区域)。



红色区域预测为钙离子结合位置。

Red area is predicted as the calcium ion binding site.

图 2 瘤背石磺 OrPLC 蛋白的三级结构模型预测  
Fig. 2 Model prediction of the tertiary structure of OrPLC protein

## 2.2 OrPLC 的同源性比较和系统进化树构建

OrPLC 基因翻译的氨基酸序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析结果显示,其与福寿螺 (*Pomacea canaliculata*) 的磷脂酶 C 样蛋白 2 的氨基酸序列 (XP\_025085674) 匹配度最高,一致性达到 88%,其次是美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 的磷脂酶 C 样蛋白 2 的氨基酸序列 (XP\_022329093) 一致性为 86%,通过 DNAMAN 对匹配度较高的蛋白质序列的同源性比较见图 3。根据 OrPLC 的氨基酸序列,选取了包括瘤背石磺在内的 15 个物种的 15 条氨基酸序列,并选择人类的磷脂酶 C 氨基酸序列作为外类群,利用 MEGA 6.0 和贝叶斯软件构建系统进化树(图 4);在进化树形中,该蛋白对应的最近的亲缘关系物种为加州海兔 (*Aplysia californica*)。

## 2.3 OrPLC 基因在不同声波频率刺激下的表达分析

瘤背石磺在不同声波刺激下的 OrPLC 基因的荧光定量 PCR 分析结果如图 5,通过和对照组比较,从 OrPLC 的定量分析图可以发现:在刺激声波频率为 10、100、160 和 310 Hz 的时候,OrPLC

基因的表达量较低;当刺激频率为 40、70、130、190 和 250 Hz 时,OrPLC 基因表达的水平较为稳定;在声波频率为 220 Hz 和 280 Hz 时,OrPLC 基因表达较高。

## 3 讨论

本次实验通过克隆技术得到了瘤背石磺神经环组织的 OrPLC 基因的全长转录本序列,并对序列进行了生物信息学分析。预测的二级结构中,该基因所编码的氨基酸链大部分组装成为  $\alpha$  螺旋结构,这为构成三维蛋白模型中与  $\text{Ca}^{2+}$  结合的活性中心提供了结构基础,此外 OrPLC 氨基酸链中存在 PH 超家族和 EF hand 结构域区域,与其他物种磷脂酶 C 的结构研究相吻合<sup>[21]</sup>。三维结构模型预测发现 OrPLC 蛋白中存在着多个能够结合  $\text{Ca}^{2+}$  的构象,这与其基于  $\text{Ca}^{2+}$  催化特性是密不可分的<sup>[22]</sup>。运用 OrPLC 氨基酸序列比构建系统进化树,结果显示瘤背石磺与加州海兔 (*A. californica*) 聚为一支,与吴容宇等<sup>[23]</sup> 研究一致,说明瘤背石磺 OrPLC 与软体动物门腹足纲贝类的亲缘关系非常接近,与传统的形态学分类相吻合,体现了 OrPLC 在进化上的保守性;OrPLC 的进化关系的分析能为研究物种的进化提供参考。

在不同声波频率刺激下 OrPLC 基因在瘤背石磺神经环组织中的表达情况结果显示,OrPLC 基因对不同声波频率刺激的反应有所差别,例如在声波频率较低(40 Hz 和 70 Hz)时该基因在所有取样时间有一个较为稳定的表达,而在用 310 Hz 的声波频率处理 0.5 h 以上时其表达受到抑制,这种急剧性的变化可能是暴露于外界噪音时间过长,导致其平衡囊受损,从而使其失去了对外界声波感知能力。本次实验中,声波刺激频率为 220 Hz 和 280 Hz 时,OrPLC 基因表达量有显著提升,可见瘤背石磺可以感知到空气中的声波变化并且对不同频率有分辨能力。在潮汐的整个涨退潮的过程中,海浪对海岸的冲击会产生一系列的声波<sup>[24]</sup>,而涨退潮这种现象是有规律变化的<sup>[25]</sup>,因此潮汐的声波应该也是有规律变化的,由此推测瘤背石磺可以感知海水涨潮时的声波,进而能够及时回归巢穴躲避潮水。

<i>Onchidium reevesii</i>	.....	0
<i>Pomacea canaliculate</i>	.....	0
<i>Crassostrea virginica</i>	MADENMTSAVSPERSSKISEVDVFNNGNTDIMEDDGRDSDDTQTPTEENYSNEPTMPRKSSFMCKDGS	67
<i>Crassostrea gigas</i>	MADENMTSAVSVERSKTSISEVDVFNNGNTDIMEDDVELDLDAQTPTEENYSNEPTMPRKSSFMCKDGS	67
<i>Onchidium reevesii</i>	.....MAYMQGSDLIKVRNSNRQYHRRFSLSSLDVSEIRWCFISKK	41
<i>Pomacea canaliculate</i>	.....MGANISRCDPATAANIIASFSAATFPKSAAGLELPHN	36
<i>Crassostrea virginica</i>	RKPPRKKTVSFSSMPTEPKIATAQDCLQCMQSGSDLIKVRNSNRQYHRRIFLNSDMTEIRWCFISKK	134
<i>Crassostrea gigas</i>	RKPPRKKTVSFSSMPTEPKIATAQDCLQCMQSGSDLIKVRNSNRQYHRRIFLNSDMTEIRWCFISKK	134
	g l f p	
<i>Onchidium reevesii</i>	PKRARIAVSRIKERVGGKTTDALRSKEIVGMYDECAFSIFGEEFFSMDLIANTPDEANIWITGLT	108
<i>Pomacea canaliculate</i>	HTKPESLVSVKPIRCGKTTDALRNKEIDGMYDECAFSIFGDDFTLIDLANTPDEANIWITGLT	103
<i>Crassostrea virginica</i>	PKRARIASRIKERVGGKTTDALRNKEIDGMYDECAFSIFGEEFFSMDLIANTPDEANIWITGLT	201
<i>Crassostrea gigas</i>	PKRARIASRIKERVGGKTTDALRNKEIDGMYDECAFSIFGEEFFSMDLIANTPDEANIWITGLT	201
	k s k e r g k t t a l k e i g y d e c a f s i f g e e f f s m d l i a n t p d e a n i w t g l t	
<i>Onchidium reevesii</i>	CLINANSKSRNSTNAIGDMCRMRDZWLLELFGSASPDIDGTLIETRVVVSIMKRINNTITTSIICQRL	174
<i>Pomacea canaliculate</i>	CLVNASTKS..AANVMDCNERVRDZWLLECFERANPDQHGILLFSEVVSIMRNRNRTITTAVICQRL	168
<i>Crassostrea virginica</i>	CLINTSAKVGTSPEVIEEMQCMRDSWLCBEMFEMERSCSAGTLLEKGVVNLVTKLNNNIPARVQQRV	268
<i>Crassostrea gigas</i>	CLINTSAKIGTSPEAIEEMQCMRDSWLCBEMFEMERSCSAGTLLEKGVVNLVTKLNNNIPARVQQRV	268
	c l n k r d w l e f g l e v v l n i q k	
<i>Onchidium reevesii</i>	KELEMRKRGDK..RGRLSSEEFISLFKEISTRPEIYFLLVRYASNADYMSITDLLLLFLEAEQGMQRV	239
<i>Pomacea canaliculate</i>	KELEMRKRGDK..RGRLSSEEFISLFKEISTRPEIYFLLVRYASNADYLSITDLLLLFLEAEQGMQRV	233
<i>Crassostrea virginica</i>	KELELNRAEAERGRINSDEEFLFKEISTRPEIYFLLVRYASNADYLSITDLLLLFLEAEQGMQRV	335
<i>Crassostrea gigas</i>	KELELNRAEVAERGRINSDEEFLFKEISTRPEIYFLLVRYASNADYLSITDLLLLFLEAEQGMQRV	335
	k e e r r g r s e f l f k e i s t r p e i y f l l v r y a s n d y t d d l l l f l e a e q g m q r v	
<i>Onchidium reevesii</i>	TKTKCLIIINRFEETKGRKRKGLGIDGFTAYLLSECDLFDDEHLSVCCDMTEPLSHYFVASSHNT	306
<i>Pomacea canaliculate</i>	TKTKCLIIISCFEFSKGRKRKGLGIDGFTAYLLSECDLFDDEHLTVCCMNEPLTHYFVASSHNT	300
<i>Crassostrea virginica</i>	TKTKCIIIIINRYEFSKGRKRKGLGIDGFTAYLLSDCLVDFEDQSKIVCCMNCPLSHYFVASSHNT	402
<i>Crassostrea gigas</i>	TKTKCIIIIINRYEFSKGRKRKGLGIDGFTAYLLSDCLVDFEDQNNIVCCMNCPLSHYFVASSHNT	402
	t k k c i i e p k g r l g i d g f t y l l s c d l f d e e h l s v c c d m t e p l s h y f v a s s h n t	
<i>Onchidium reevesii</i>	YLLDQIKGPPSSVDGYTRALRKGRCRLELDCWDGPNDEPIYHGHTITSKISFKAVIEIINTYAFET	373
<i>Pomacea canaliculate</i>	YLLMEDQIKGPPSSIEGYTRALRKGRCRFLVLDWCWDGPNDEPIYHGHTITTKISFRSVIETINEYAFEV	367
<i>Crassostrea virginica</i>	YLLKQIKGPPSSVDGYTRALRNGCRVCLDCWDGPNDEPIYHGHTITSKILFKAVIEIINTYAFET	469
<i>Crassostrea gigas</i>	YLLKQIKGPPSSVDGYTRALRNGCRVCLDCWDGPNDEPIYHGHTITSKIKFKAVIEIINTYAFET	469
	y l l d q l g p s s v d g y t r a l r k g r c r l e l d c w d g p n d e p i y h g h t t s k i s f k a v i e i i n t y a f e t	
<i>Onchidium reevesii</i>	SEYPVILSIENHCSVKKQQMAHFVKSVLGDKLFTDNVLSRRTLPSPCFKFKGILRKGKLELNSE	440
<i>Pomacea canaliculate</i>	SEYPVILSIENHCSVKKQQMAHCVTEVFGDKLYLNSVDEKQTSLPSPESIKGHLRKAAPAEITD	434
<i>Crassostrea virginica</i>	SEYPVILSIENHCSIKQQQMAHYMTAFEDDKLRCDCVRAENESCLPSPETLKKKLIIVRKGKLEPNSE	536
<i>Crassostrea gigas</i>	SEYPVILSIENHCSIKQQQMAHYMTIFGKCLLIVYGENESCLPSPETLKKKLIIVRKGKLEPNSE	536
	s e p v i l s i e n h c s v k k q q m a h f v k s v l g d k l f t d n v l s r r t l p s p c f k f k g i l r k g k l e l n s e	
<i>Onchidium reevesii</i>	SNEGVTDEDEGABPEKKRNSK.REGSVKHKHLAKELSDLVNYCVSRRFDFCTSCQCKYWEINSL	506
<i>Pomacea canaliculate</i>	TNEGVTDEDEGABPEKKRNSK.REGSVKHKHLAKELSDLVNYCVSRRFDFHSCQCKYWEINSL	500
<i>Crassostrea virginica</i>	..DDYVTDEDEGABSDKKRNKTKDHPVKKHKLAKELSDLVNYCVSRRFDFCTSCQCKYWEINSL	601
<i>Crassostrea gigas</i>	..DDYVTDEDEGABSDKKRNKTKDHPVKKHKLAKELSDLVNYCVSRRFDFCTSCQCKYWEINSL	601
	y v t d e d e g a e k k n k k k h k l a k e l s d l v n y c v s r r f d f c t s c q c k y w e i n s l	
<i>Onchidium reevesii</i>	SESCALKLAISCFEEFVNHNKFKLSRIYPNGMRVDSSNNEPDLWCGCQVVALNYQTGLMMDLYH	573
<i>Pomacea canaliculate</i>	SESCALKLAISHPEEFVNHNRRYLSRVYNSMRVDSSNNEPDLWTCGCQVVALNYQTGLMMDLYN	567
<i>Crassostrea virginica</i>	SESTAKLAISCFEEFVNHNKFKLSRIYPNGMRVDSSNNEPDLWCGCQVVALNYQTGLMMDLYN	668
<i>Crassostrea gigas</i>	SESTAKLAISCFEEFVNHNKFKLSRIYPNGMRVDSSNNEPDLWCGCQVVALNYQTGLMMDLYN	668
	s e s a k l a s c f e e f v n h n k f l s r i y p n g m r v d s s n n e p d l w c g c q v a l n y q t g l m m d l y h	
<i>Onchidium reevesii</i>	GFFRNACGCIILKPAIMREEIAYFSANTRDIPGVSPQILHKVVISGCFEPKPKGS	627
<i>Pomacea canaliculate</i>	GFFLNAGCCGYVLPKPAIMREEIAYFSANTRDIPGVSPQILHKIISGCFEPKPKGS	624
<i>Crassostrea virginica</i>	GFFRRNACGCIILKPAIMREEIAYFSANTRDIPGVSPQILHKVVISGCFEPKPKGS	725
<i>Crassostrea gigas</i>	GFFRRNACGCIILKPAIMREEIAYFSANTRDIPGVSPQILHKVVISGCFEPKPKGS	725
	g f n c g l k p a i m r e e i a y f s a n t r d i p g v s p q i l h k v v i s g c f e p k p k g s	

图3 OrPLC的氨基酸序列与同源性较高的PLC氨基酸序列的多重序列比对

Fig.3 Multiple sequence alignment of OrPLC amino acid sequence with PLC protein

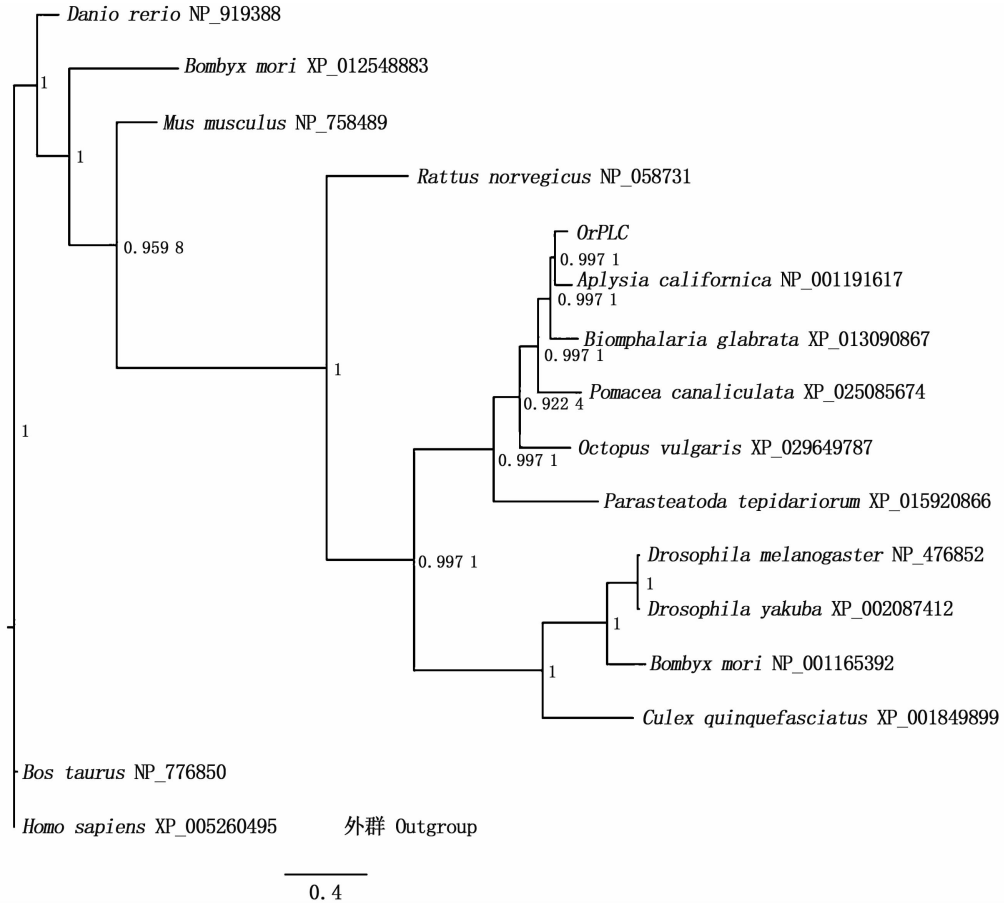


图 4 基于 15 个物种的 PLC 氨基酸序列构建的系统进化树

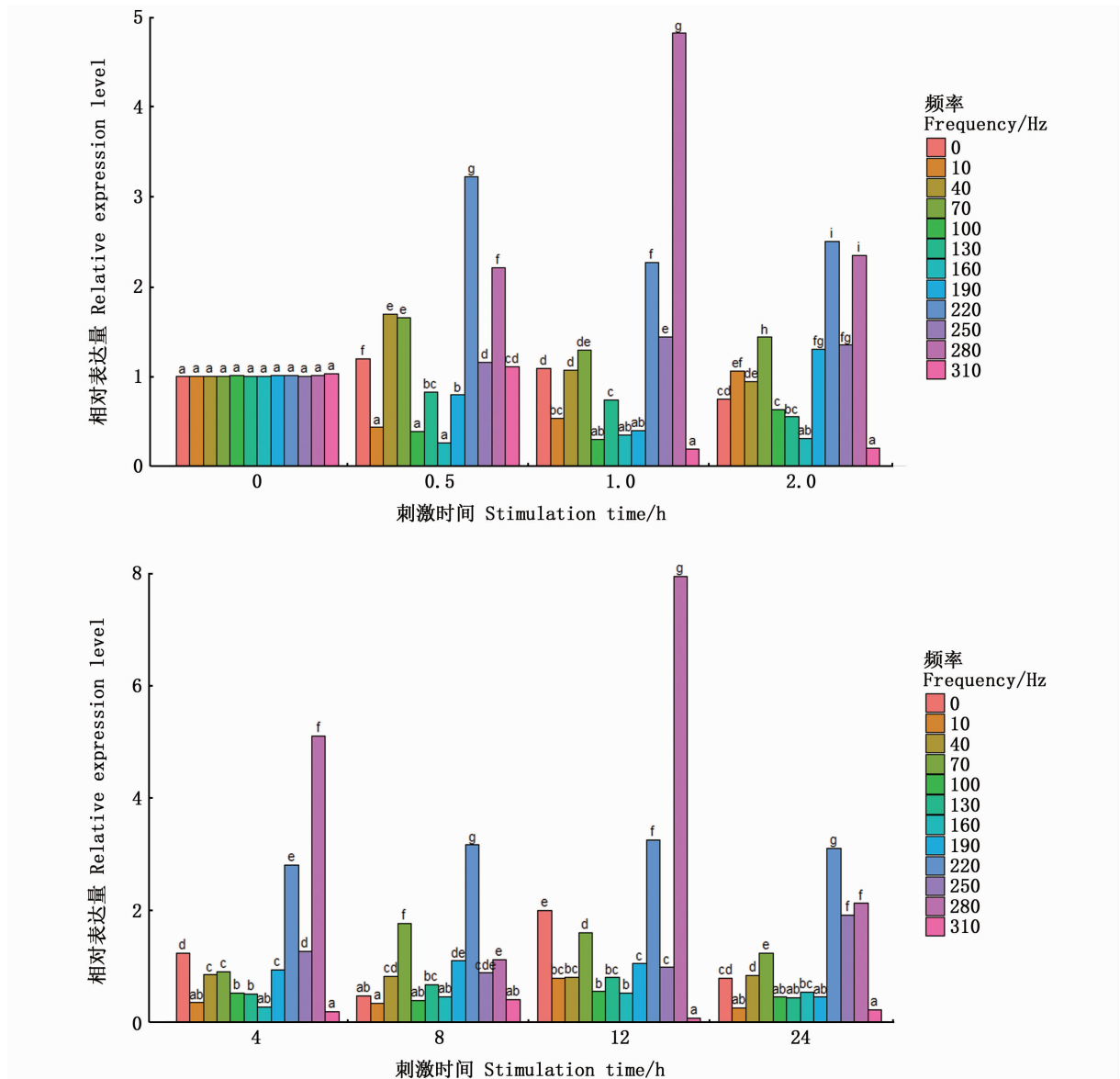
Fig. 4 Phylogenetic tree constructed based on PLC amino acid sequences of 15 species

栖息潮间带的瘤背石磺的归家行为取决于潮汐周期,而 1 个半日潮的潮汐周期约为 12.4 h<sup>[25]</sup>, SCHNYTZER 等<sup>[26]</sup>研究了齿轮帽贝 (*Cellana rota*) 12.4 h 的潮汐节律变化,发现了相关调控基因的变化与潮汐节律相互吻合,所以尽管没有低频声音的刺激,对照组的 *OrPLC* 的表达量在 12 h 依旧较高,而当受到外部低频刺激时,可能会影响原有的长期记忆从而影响了 *OrPLC* 的表达,另外目前已有实验表明在长期记忆的形成过程中,长时间昼夜节律会影响瘤背石磺的记

忆形成<sup>[27]</sup>,而本次实验中,不同时间组未有长时间的昼夜变化,因此在不同时间的维度下 *OrPLC* 的变化没有明显规律。

综上所述,本实验成功克隆出瘤背石磺体内的 *OrPLC* 基因全长转录本序列,并进行了生物信息学的预测分析,其 *OrPLC* 蛋白质结构与其他物种的磷脂酶 C 的结构类似,进化比较保守;荧光定量 PCR 结果显示瘤背石磺可以感知空气中声波刺激,将为进一步研究瘤背石磺的潮汐感知功能提供基础。





不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

图5 *OrPLC* 基因在瘤背石磺神经环中不同声波频率下的表达量

Fig.5 Expression of *OrPLC* at different acoustic frequency in *O. reevesii* ganglion

参考文献:

[1] BOUCHET P, ROCROI J P, FRDA J, et al. Classification and nomenclator of gastropod families [J]. *Malacologia*, 2005, 47(1/2): 1-368.

[2] 吴旭峰, 沈和定, 吴文健, 等. 我国华东沿海4种石磺形态学比较[J]. *动物学杂志*, 2010, 45(6): 92-100.

WU X F, SHEN H D, WU W J, et al. Comparison on morphology of onchidiidae in eastern coast of China [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2010, 45(6): 92-100.

[3] 张坤霞. 我国石磺科形态结构再描述及同工酶分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.

ZHANG K X. Study of morphology and isozymes of Onchidiidae in China [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013.

[4] P ARPAGNOLI D, PECCHIOLI S, SANTINI G. Temporal determinants of grazing activity in the Mediterranean limpet *Patella caerulea* [J]. *Ethology Ecology & Evolution*, 2013, 25(4): 388-399.

[5] SATOH A, YOSHIOKA E, NUMATA H. Circatidal activity rhythm in the mangrove cricket *Apteronomobius asahinai* [J]. *Biology Letters*, 2008, 4(3): 233-236.

[6] AREY L B, CROZIER W J. The 'Homing Habits' of the

- pulmonate mollusk *Onchidium* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1918, 4(11): 319-321.
- [7] 刘杰, 黄金田. 瘤背石磺产卵规律与天文潮汐关系[J]. 上海海洋大学学报, 2018, 27(1): 73-78.
- LIU J, HUANG J T. The relationship between *Onchidium struma*'s spawning regularity and astronomical tides [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2018, 27(1): 73-78.
- [8] 张国胜, 顾晓晓, 邢彬彬, 等. 海洋环境噪声的分类及其对海洋动物的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(1): 89-94.
- ZHANG G S, GU X X, XING B B, et al. The classification and the impact of marine environment noise on marine animals [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(1): 89-94.
- [9] SOLÉ M, LENOIR M, FORTUÑO J M, et al. Evidence of Cnidarians sensitivity to sound after exposure to low frequency noise underwater sources [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 37979.
- [10] KAIFU K, AKAMATSU T, SEGAWA S. Underwater sound detection by cephalopod statocyst [J]. Fisheries Science, 2008, 74(4): 781-786.
- [11] 梁威, 吴容宇, 严彩瑞, 等. 低频声波频率下瘤背石磺 *CaM-like*, *CaMKII* 基因的表达及功能[J]. 中国水产科学, 2020, 27(2): 166-176.
- LIANG W, WU R Y, YAN C R, et al. Expression of *CaM-like* and *CaMKII* genes in *Onchidium reevesii* under low frequency sound wave stimulation [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(2): 166-176.
- [12] KADAMUR G, ROSS E M. Mammalian phospholipase C [J]. Annual Review of Physiology, 2012, 75(1): 127-154.
- [13] ESSEN L O, PERISIC O, KATAN M, et al. Structural mapping of the catalytic mechanism for a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C [J]. Biochemistry, 1997, 36(7): 1704-1718.
- [14] CHIN D, MEANS A R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor [J]. Trends in Cell Biology, 2000, 10(8): 322-328.
- [15] PENG C, ZHAO X G, LIU S X, et al. Effects of anthropogenic sound on digging behavior, metabolism,  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  ATPase activity, and metabolism-related gene expression of the bivalve *Sinonovacula constricta* [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24266.
- [16] WONG A C Y, BIRNBAUMER L, HOUSLEY G D. Canonical transient receptor potential channel subtype 3-mediated hair cell  $Ca^{2+}$  entry regulates sound transduction and auditory neurotransmission [J]. European Journal of Neuroscience, 2013, 37(9): 1478-1486.
- [17] 梁威, 杨铁柱, 沈和定, 等. 瘤背石磺钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶IV (CaMK IV) 基因的克隆及组织表达[J]. 水产学报, 2019, 43(11): 2336-2346.
- LIAN W, YANG T Z, SHEN H D, et al. Cloning and tissue expression analysis of the calcium/calmodulin dependent protein kinase IV gene (CaMK IV) in *Onchidium struma* [J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(11): 2336-2346.
- [18] 李杰, 许国绿, 沈和定, 等. 石磺钙调蛋白 *Os-IP3R* 和 *Os-RyR* 基因的克隆、相对表达量及进化关系[J]. 水产学报, 2018, 42(12): 1857-1868.
- LI J, XU G L, SHEN H D, et al. Clone and relative expression of *Os-IP3R* and *Os-RyR* to discuss the evolutionary relationship in Onchidiidae [J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(12): 1857-1868.
- [19] YANG T Z, GU B N, XU G L, et al. Identification of candidate reference genes for qRT-PCR normalization studies of salinity stress and injury in *Onchidium reevesii* [J]. PeerJ, 2019, 7: e6834.
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] 刘丽荣, 夏时海. 磷脂酶 C 结构及活化机制的研究进展 [J]. 武警医学院学报, 2006, 15(2): 175-178.
- LIU L R, XIA S H. Progress in the structure of phospholipase C and mechanisms of its activation [J]. Acta Academiae Medicinae CPAPF, 2006, 15(2): 175-178.
- [22] BRUZIK K S, TSAI M D. Toward the mechanism of phosphoinositide-specific phospholipases C [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1994, 2(2): 49-72.
- [23] 吴容宇, 梁威, 李志涵, 等. 瘤背石磺 *Egr-1* 基因的克隆、分析及低频声音刺激对其表达的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(2): 622-630.
- WU R Y, LIAN W, TU Z H, et al. Cloning and expression analysis of the *Egr-1* gene of *Onchidium reevesii* and low frequency sound stimulation on gene expression [J]. Genomics and Applied Biology, 2021, 40(2): 622-630.
- [24] BONDAR' L F, BUGAEVA L K, RUTENKO A N. Effect of tide on sound propagation in the shelf zone of the Sea of Japan [J]. Acoustical Physics, 2000, 46(5): 534-543.
- [25] 张凯宁. 潮汐成因探讨[J]. 大学物理, 2014, 33(10): 31-34.
- ZHANG K N. Discussion on the cause of tide [J]. College Physics, 2014, 33(10): 31-34.
- [26] SCHNYTZER Y, SIMON-BLECHER N, LI J, et al. Tidal and diel orchestration of behaviour and gene expression in an intertidal mollusc [J]. Scientific Reports, 2018, 8: 4917.
- [27] XU G L, YANG T Z, SHEN H D. Effect of circadian clock and light-dark cycles in *Onchidium reevesii*: possible implications for long-term memory [J]. Genes (Basel), 2019, 10(7): 488.

## Cloning and expression of the phospholipase C gene in *Onchidium reevesii* under different frequency sound wave stimulation

YANG Tiezhu<sup>1,2</sup>, RAO Rongcheng<sup>1</sup>, HUANG Xiaohan<sup>1</sup>, WU Rongyu<sup>1</sup>, JIA Jingjing<sup>1</sup>, SHEN Heding<sup>1,3</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Fishery Biological Engineering Technology Research Center of Henan Province, College of Fisheries, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang 464000, Henan, China; 3. Marine Animal System Classification and Evolution Shanghai University Key Laboratory, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Phospholipase C (Phospholipase C, PLC) is a class of enzymes related to membrane proteins, which play an important role in signal transduction pathways. *Onchidium reevesii* that inhabits the intertidal zone can perceive the local tidal laws. In order to explore the role and molecular mechanism of phospholipase C in *O. reevesii* in tide sensing, in this experiment, we used the ganglion of *O. reevesii* as the experimental material. The cDNA sequence of PLC gene was cloned by RACE-PCR technology, and bioinformatics analysis and qRT-PCR experiment were performed. The results showed that the full length of the cDNA of the PLC gene consists of 2 578 base pairs, the open reading frame (ORF) is 1 881 bp, the 5' non-coding (UTR) region is 337 bp, the 3' non-coding region (UTR) is 340 bp, and there is an AATAAA tailing signal at the end, which encodes a total 627 amino acids. The result of amino acid sequence comparison showed that the PLC gene of *O. reevesii* has the highest match with the phospholipase C-like protein 2 amino acid sequence of *Pomacea canaliculata*, with a similarity of 88%, followed by the phospholipase C-like protein 2 amino acid sequence of *Crassostrea virginica*, and it is consistent with the classification of traditional morphology. Using the low frequency sound in the tide in the laboratory to stimulate the *O. reevesii*, the expression of PLC gene at different frequencies was detected by fluorescence quantitative PCR. The results showed that the expression of PLC was basically stable when the stimulation sound wave frequency was 40 Hz – 70 Hz. When the frequency was increased to 160 Hz – 310 Hz, it was in a state of low expression. When the sound wave frequency reached 220 Hz and 280 Hz, it was in a state of high expression, indicating that this gene plays an important role in the low-frequency perception of *O. reevesii*. This experiment lays a theoretical support for further understanding of the tidal sensing function of the *O. reevesii*.

**Key words:** *Onchidium reevesii*; phospholipase C; low-frequency sound; tidal rhythm; qRT-PCR