

双壳贝类 *CKI* 基因家族的鉴定及表达分析*

孙凤芝¹ 吕珍立¹ 刘福云¹ 邢强¹ 连姗姗¹ 王师^{1,2,3} 包立随⁴

(1. 中国海洋大学海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室 山东青岛 266003; 2. 崂山实验室海洋生物学与生物技术功能实验室 山东青岛 266237; 3. 中国海洋大学热带海洋生物种质资源开发与种业工程中心 海南三亚 572000; 4. 中国海洋大学海洋生物多样性与进化研究所 山东青岛 266003)

摘要 酪蛋白激酶 1 (*CKI*) 是一种重要的蛋白激酶家族, 其在 DNA 损伤应答和修复、细胞增殖和凋亡、胚胎发育和稳态等重要的生物学过程中都具有复杂多样的调控作用。为了理解 *CKI* 基因家族在双壳贝类中的特征、进化及生物学功能, 实验采用比较基因组学及生物信息学的方法对双壳贝类 *CKI* 基因家族进行了鉴定分析, 通过虾夷扇贝高温应激实验, 研究了 *CKI* 基因家族在高温应激时的表达规律。结果显示, 在虾夷扇贝、栉孔扇贝、长牡蛎与侏儒蛤中均存在 *CKI α* , *CKI α like*, *CKI δ* , *CKI γ 3*, 并发现 *CKI ϵ* , *CKI γ 1*, *CKI γ 2* 在双壳贝类中发生了丢失。时空表达分析发现, 双壳贝类 *CKI* 基因均在胚胎发育早期集中表达, 并以多细胞/囊胚期为界呈现出母源/合子特异性表达模式。*CKI* 为关键基因的基因共表达模块显著富集在错配修复、核苷酸剪切修复等相关通路上, 暗示了 *CKI* 基因在双壳贝类胚胎发育过程中参与调控 DNA 损伤修复过程, 从而维持早期胚胎发育时的基因组稳定性。双壳贝类 *CKI* 基因在成体中呈现组织特异的表达模式, 主要在鳃和雄性性腺中具有相对较高的表达量。虾夷扇贝受到高温应激后, 其鳃中 *PyCKI α* , *PyCKI α like* 和 *PyCKI δ* 在前 3 h 显著上调, 但在 12 h 后趋于下调, 而 *PyCKI γ 3* 在高温应激不同时间点均表现出下降趋势, 表明双壳贝类 *CKI* 基因参与响应高温应激反应。此项研究有助于理解双壳贝类 *CKI* 基因的功能和进化, 为解析双壳贝类胚胎发育稳态维持和应激调节机制提供理论基础。

关键词 双壳贝类; *CKI* 基因家族; 基因鉴定; 表达分析; 高温应激

中图分类号 Q38 doi: 10.11693/hyhz20221200336

酪蛋白激酶 1 (Casein kinase 1, *CKI*) 是生物体内一种丝氨酸/苏氨酸特异性激酶家族, 是最早鉴定的激酶之一, 其在多种动物类群中均有报道。在脊椎动物中, 哺乳类共鉴定出 7 种 *CKI* 家族成员(α 、*alike*、 γ 1、 γ 2、 γ 3、 δ 和 ϵ) 以及 α 、 δ 、 ϵ 和 γ 3 的几种剪接变体(Gross *et al*, 1998; Knippschild *et al*, 2005; Fulcher *et al*, 2020)。在斑马鱼(*Danio rerio*) 中存在 6 个成员(α 、 γ 1、 γ 2a、 γ 2b、 δ 和 ϵ) (Albornoz *et al*, 2007), 但在无脊椎动物秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*) 中发现了 52 个 *CKI* 基因, 其中可能含有很高比例的假基因, 并不行使功能(Manning *et al*, 2002a, 2002b; Hirst

et al, 2020)。所有 *CKI* 家族成员在其激酶结构域序列都表现出高度保守性, 经典的 *CKI* 蛋白激酶基序由序列 Ser/Thr-X-X-(X)-Ser/Thr 构成(Flotow *et al*, 1990; Meggio *et al*, 1992)。它们的差异存在于 N 端和 C 端的非催化结构域, 其中 N 端分子量较小且主要由 β -转角组成, C 端分子量较大且主要是由 α -螺旋组成。尽管在组织分布和亚细胞定位方面存在差异, 但 *CKI* 基因家族各成员在功能上具有一定的相似性, 主要参与 DNA 损伤应答和修复、细胞增殖和凋亡、胚胎发育和稳态等重要的生物学过程(Cheong *et al*, 2011)。

CKI 激酶家族是面对应激源时介导细胞快速、充

* 国家重点研发计划项目, 2022YFD2400301 号; 山东省重点研发计划项目, 2021ZL GX03 号。孙凤芝, 硕士研究生, E-mail: sfz17864730219@163.com

通信作者: 包立随, 硕士生导师, 副教授, E-mail: baolisui@ouc.edu.cn

收稿日期: 2022-12-20, 收修改稿日期: 2023-02-28

分进行应激反应的重要介质(Knippschild *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2019)。有研究表明, 极端温度下 *CKI* 可以介导 Hsp70 和 Hsp90 的磷酸化参与组织稳态调控(Muller *et al.*, 2013), 同时 *CK1 α* 还参与细胞程序性凋亡的过程(Zelenak *et al.*, 2012); 在杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*)中, *CKI* 可以磷酸化 Hsp23 以维持其温度应激敏感性(Kröber-Boncardo *et al.*, 2020); 在布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)中, *CKI* 能够与 RNA 结合蛋白 ZC3H11 发生作用以应对温度应激和维持细胞生长(Minia *et al.*, 2016)。哺乳动物在缺氧应激状态下, *CK1 δ* 能够将缺氧诱导因子(HIF-1 α)磷酸化, 以控制 HIF-1 的活性从而维持稳态(Kaloussi *et al.*, 2010)。另外有研究表明, 细胞处于基因毒性应激状态时, *CKI* 通过对肿瘤抑制因子 p53 的磷酸化作用介导 DNA 损伤的修复(Huart *et al.*, 2009), 这对于调控细胞生长和基因组完整性具有重要作用(Winter *et al.*, 2004; MacLaine *et al.*, 2008)。

扇贝、长牡蛎等双壳贝类是我国的重要经济贝类, 适宜的环境温度是维持其正常生命活动的必要条件, 近年来夏季海水温度上升引起高温应激成为导致双壳贝类出现大规模死亡的重要原因(Said *et al.*, 2022)。作为机体高温应激时重要的调节激酶, 开展双壳贝类 *CKI* 基因的鉴定和研究, 明确其在高温应激时的表达规律, 有助于深入了解其在机体高温应激的调节机制, 为双壳贝类良种选育与养殖提供理论基础。因此, 本研究对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)和侏儒蛤(*Mulinia lateralis*)等 4 种双壳贝类物种的 *CKI* 基因家族进行了全基因组鉴定和特征分析。通过结构比对和时空表达分析探究双壳贝类中 *CKI* 蛋白结构、表达模式和高温应激反应规律。这是首次对双壳贝类动物中 *CKI* 基因家族的系统筛查和特征描述研究, 为深刻理解双壳贝类 *CKI* 的基因特性、进化关系和调控功能提供了重要的研究基础。

1 材料与方法

1.1 双壳贝类 *CKI* 基因家族鉴定

为了鉴定双壳贝类 *CKI* 家族成员基因, 在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Uniprot (<https://www.uniprot.org/>)和 ENSEMBL (<http://ensemblgenomes.org/>)数据库下载代表性的脊椎动物: 人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、斑马鱼(*D. rerio*)和无脊椎动物秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)

的全长 *CKI* 蛋白序列(表 1), 将以上蛋白序列与四种双壳贝类的基因组和转录组进行比对以鉴定 *CKI* 家族基因($e < 1 \times 10^{-5}$) (Altschul *et al.*, 1990)。为了确保 *CKI* 基因家族鉴定的完整性, 通过 HMM 搜索方法 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/phmmer>) 进行序列分析, 并对所有潜在的双壳贝类 *CKI* 蛋白的保守结构域进行了比对。

1.2 序列分析

将候选的双壳贝类 *CKI* 家族成员序列提交给 ORF Finder 程序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测 ORF (开放阅读框), 并将预测的 ORF 翻译成氨基酸序列。使用 SMART (Letunic *et al.*, 2021)程序 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对翻译后的蛋白质序列进行 *CKI* 保守结构域的认识。Sequence Manipulation Suite 工具 (http://www.bioinformatics.org/sms2/color_align_cons.html)用于序列比对分析, ProtParam(Wilkins *et al.*, 1999)工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)用来预测等电点(PI)、分子量(MV)不稳定指数(Instability index)和疏水性(Gravy)。用 IBS1.0.3(Liu *et al.*, 2015)软件绘制了所有已鉴定的 *CKI* 基因家族成员的蛋白结构。使用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)对所有双壳贝类 *CKI* 基因家族成员进行蛋白质三级结构的预测。

1.3 系统发育分析

在 NCBI 数据库、Uniprot 数据库和 Ensembl 数据库中下载人(*H. sapiens*)、小鼠(*M. musculus*)、非洲爪蟾(*X. laevis*)、青鳞鱼(*Oryzias latipes*)、斑马鱼(*D. rerio*)、海鞘(*Ciona intestinalis*)、文昌鱼(*Branchiostoma floridae*)、光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)、秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)和柱状珊瑚(*Stylophora pistillata*)共 11 个物种的 *CKI* 蛋白全长序列(表 1), 与鉴定到的 4 种双壳贝类的 *CKI* 蛋白全长序列共同用于构建系统发生树, 使用 MEGA7(Kumar *et al.*, 2016)软件中的 ClustalW(Larkin *et al.*, 2007)方法进行多序列比对, 使用 NJ 方法对 *CKI* 进行系统发生树构建, Bootstrap 法进行重复检验, 重复 1 000 次。使用 iTOL 进行优化与展示。

1.4 双壳贝类 *CKI* 基因家族时空表达分析

为了进行表达分析, 从已发表的虾夷扇贝(Wang *et al.*, 2017)、栉孔扇贝(Li *et al.*, 2017)、长牡蛎(Zhang *et al.*, 2012)和侏儒蛤(实验室未发表数据)的不同胚胎发育阶段和成体组织的转录组数据中计算 *CKI* 基因家族的表达量 TPM (Transcript per Million)值。其中胚胎

表 1 分析所用蛋白序列注册号
Tab.1 The accession numbers of proteins used for analysis

物种	基因	登录号	物种	基因	登录号	
人 <i>H. sapiens</i>	<i>CK1a</i>	P48729	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	<i>CK1a</i>	Q8JGT0	
	<i>CK1alike</i>	Q8N752		<i>CK1δ</i>	Q7T2E3	
	<i>CK1δ</i>	P48730		<i>CK1ε</i>	Q6P109	
	<i>CK1ε</i>	P49674		<i>CK1γ1</i>	Q5PRD4	
	<i>CK1γ1</i>	Q9HCP0		<i>CK1γ2</i>	B0S605	
	<i>CK1γ2</i>	P78368		海鞘 <i>C. intestinalis</i>	<i>CK1a</i>	BAD54833.1
	<i>CK1γ3</i>	Q9Y6M4			<i>CK1alike</i>	CDW38362.1
小鼠 <i>M. musculus</i>	<i>CK1a</i>	Q8BK63	文昌鱼 <i>B. floridae</i>	<i>CK1a</i>	XP_035672526.1	
	<i>CK1δ</i>	Q9DC28		<i>CK1δ</i>	XP_035696210.1	
	<i>CK1ε</i>	Q9JMK2		<i>CK1ε</i>	XP_035696211.1	
	<i>CK1γ1</i>	Q8BTH8	<i>CK1γ3</i>	XP_035666971.1		
	<i>CK1γ2</i>	Q8BVP5	光滑双脐螺 <i>B. glabrata</i>	<i>CK1a</i>	XP_013070859.1	
	<i>CK1γ3</i>	Q8C4X2		赤拟谷盗 <i>T. castaneum</i>	<i>CK1alike</i>	KYB25276.1
非洲爪蟾 <i>X. laevis</i>	<i>CK1a</i>	P67963	秀丽隐杆线虫 <i>C. elegans</i>		<i>CK1ε</i>	Q20471
	<i>CK1δ</i>	AAAX22003.1		<i>CK1γ1</i>	AAW21314.1	
	<i>CK1ε</i>	AAF01032.1	柱状珊瑚 <i>S. pistillata</i>	<i>CK1γ3</i>	A0A2B4RJK2	
	<i>CK1γ1</i>	Q6NRT0				
	<i>CK1γ2</i>	NP_001086018.1				
青鳞鱼 <i>O. latipes</i>	<i>CK1γ3</i>	NP_001090597.1				
	<i>CK1a</i>	H2N284				
	<i>CK1δ</i>	H2MS42				
	<i>CK1ε</i>	H2MHK0				
	<i>CK1γ1</i>	H2L7T9				
	<i>CK1γ2</i>	A0A3B3HJ60				
	<i>CK1γ3</i>	XP_023810057.1				

发育阶段包括受精卵、多细胞、囊胚、原肠胚、担轮幼虫、D 型幼虫、壳顶幼虫前期、壳顶幼虫中期、壳顶幼虫后期、匍匐幼虫、稚贝；成体组织包括肝胰腺、鳃、外套膜、肌肉、雄性性腺和雌性性腺。为了可视化 *CKI* 基因家族在四种双壳贝类动物中的表达模式，通过 R 软件包进行绘制热图。

1.5 双壳贝类胚胎发育基因共表达网络构建

利用 R 中的 WGCNA 软件包(Langfelder *et al.*, 2008)构建了双壳贝类个体发育的基因共表达网络，虾夷扇贝、栉孔扇贝、长牡蛎和侏儒蛤分别有 20 418、22 179、23 573、22 941 个基因参与构建基因共表达网络，基因模块最小基因数为 300。基因共表达网络不同模块使用不同颜色进行标记，未分配的基因用灰色标记，模块中基因的关键程度通过计算模块内基因连通度来决定，并对 *CKI* 家族成员所在模块进行连通度以及 KEGG 富集分析。

1.6 高温应激实验

采集活性好的 40 只 2 龄虾夷扇贝个体进行高温应激实验。实验前，将所有个体随机平分两个平行组，并在实验室分开暂养 7 d，使其适应实验室养殖环境，期间水温维持在 10 °C，每天换水 1/2，投喂扁藻等单胞藻，投饵量为 5×10^4 ind./mL。实验时，将两个平行组个体由 10 °C 暂养水体分别同时迅速转移至两个 23 °C 水体当中(充足供氧)。在温度骤变后的 0、3、6、12 和 24 h 分别从两个平行组中随机取 3 只虾夷扇贝，迅速解剖并收集其鳃，组织分离后立刻使用液氮冷冻，-80 °C 保存以备总 RNA 的提取。

1.7 RNA 提取和实时定量 PCR (qPCR)分析

使用实验室前期发表 RNA 提取方法(Hu *et al.*, 2006)，从采样的虾夷扇贝的鳃中提取总 RNA，然后用 DNaseI 消化。使用 Nanovue Plus 分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度，通过琼脂糖凝胶电泳评估 RNA 的完整性。使用莫洛尼小鼠白血病病毒(MMLV)逆转

录酶在 20 μL 的体系中合成第一链 cDNA, 每个样本总 RNA 含量 2 μg 作为模板, 0.5 mg 的 Oligo(dT)₁₈ 作为引物。混合体系在 65 $^{\circ}\text{C}$ 下变性 5 min, 然后在冰上立即冷却。加入反转录酶、反应缓冲液和 dNTPs 后, 在以下条件下扩增 cDNA: 42 $^{\circ}\text{C}$ 90 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。将 cDNA 稀释至 10 ng/ μL , 保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$, 作为 qPCR 的模板。EF1A 被用作反应所需的内参基因 (Santerre *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016), 所有引物都是用 Primer 5.0 软件设计的, 使用 BLASTN (1×10^{-10}) 将所设计的引物与虾夷扇贝基因组进行比较以验证其特异性, 并列于表 2。使用 LightCycler 480 实时定量 PCR 仪(Roche)进行扩增。

表 2 虾夷扇贝 *CKI* 基因及内参基因引物序列
Tab.2 Sequences of primers for *CKI* gene and internal reference gene of *P. yessoensis*

基因名称	引物序列(5'~3')
<i>PyCK1α-F</i>	TTGCGTATCGGGCAGTTC
<i>PyCK1α-R</i>	CCTGACAATTTCTTAATGGG
<i>PyCK1alike-F</i>	CCTTGTTGCAGTGACGACC
<i>PyCK1alike-R</i>	GCAGATCAGATGATAAACAGG
<i>PyCK1δ-F</i>	GCAAGGAGGAGTGGAAT
<i>PyCK1δ-R</i>	GCTTATCAACTGATCTGCCAG
<i>PyCK1γ3-F</i>	GCCAAGTTCAAATCAAAGGG
<i>PyCK1γ3-R</i>	GGAAGTACCACCTGAACTGA
<i>EF1A-R</i>	GTTACAGTTCAGCCTTCAGT
<i>EF1A-F</i>	GCGGTGGTATTGACAAGAGA

表 3 双壳贝类 *CKI* 基因家族特征总结

Tab.3 Summary in characteristics of *CKI* gene family in four bivalves

	长度/aa	蛋白分子量/kDa	等电点	不稳定性指数	疏水性	α -螺旋数目	β -折叠数目	β -转角数目	无规卷曲数目
<i>PyCK1α</i>	327	37.57	9.83	39.88	-0.407	17	12	14	25
<i>PyCK1alike</i>	347	39.83	9.74	49.36	-0.301	21	13	16	27
<i>PyCK1δ</i>	419	47.79	10.25	39.48	-0.639	18	13	16	33
<i>PyCK1γ3</i>	461	52.73	8.59	38.07	-0.790	21	16	18	32
<i>CfCK1α</i>	329	37.67	9.77	42.51	-0.388	14	12	13	23
<i>CfCK1alike</i>	332	38.25	9.96	44.70	-0.407	20	13	14	27
<i>CfCK1δ</i>	419	47.67	10.25	38.63	-0.656	17	12	15	31
<i>CfCK1γ3</i>	460	52.87	9.26	44.80	-0.563	20	15	12	30
<i>CgCK1α</i>	323	37.28	9.88	45.20	-0.423	20	11	16	22
<i>CgCK1alike</i>	386	44.75	10.06	38.72	-0.244	22	16	17	26
<i>CgCK1δ</i>	483	54.28	10.44	37.55	-0.710	21	17	18	17
<i>CgCK1γ3</i>	467	53.21	8.95	46.20	-0.791	19	16	15	32
<i>MICK1α</i>	323	37.16	9.80	42.00	-0.411	15	12	15	24
<i>MICK1alike</i>	351	40.45	9.71	47.36	-0.500	18	14	14	24
<i>MICK1δ</i>	467	52.52	10.12	38.66	-0.637	20	16	17	31
<i>MICK1γ3</i>	425	49.14	9.46	41.97	-0.800	20	16	14	28

实时定量 PCR 反应过程如下: 取 2 μL cDNA 作为反应模板, 加入 10 μL SYBR Green I Real-time PCR Master Mix, 上、下游引物(2 $\mu\text{mol/L}$)各 4 μL , 最终得到 20 μL 的反应体系。反应程序如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 1 个循环。进一步通过熔解曲线验证引物特异性, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算 *CKI* 基因的相对表达量。基于各基因的相对表达水平, 使用 SPSS 软件进行数据的统计分析, 使用独立 t 检验的统计软件包, 分析各 *CKI* 基因表达变化的规律。

2 结果

2.1 双壳贝类 *CKI* 基因家族全基因组的鉴定和结构分析

通过多物种、多组学的系统比对策略, 从虾夷扇贝、栉孔扇贝、长牡蛎、侏儒蛤的全基因组中均鉴定出 4 个 *CKI* 家族成员, 包括 *CK1 α* , *CK1alike*, *CK1 δ* , *CK1 γ 3*, 并发现 *CK1 ϵ* , *CK1 γ 1*, *CK1 γ 2* 在双壳贝类中发生了丢失。根据 CK1 蛋白结构(表 3), *CK1 δ* 和 *CK1 γ 3* 氨基酸序列长度(>400 aa)明显大于 *CK1 α* 和 *CK1alike* (300~400 aa)。各 CK1 家族成员均是疏水性蛋白质且稳定性较好。另外, 蛋白质的二级结构信息显示, 除了 *CgCK1 δ* 中的 α -螺旋数目最多, 其他的蛋白二级结构中的无规卷曲的数目最多, 其次是 α -螺旋数目, β -折叠和 β -转角的数目相似。通过对双壳贝类 CK1 的保守结构域的多重序列比对发现 CK1 最佳的磷酸化基序均为 T-G-T (图 1)。



图 1 双壳贝类 CK1 蛋白序列比对

Fig.1 CK1 protein sequences alignment in four bivalve species
注: 红色三角形标注的是 CK1 经典磷酸化基序

4 种双壳贝类动物的 CK1 均包括一个分子量较小的 N 端, 主要由 β -折叠组成, 和一个分子量较大的 C 端, 主要由 α -螺旋状组成。其中 N-末端的分子量范围 0.95~5.80 kDa, C-末端的分子量范围 4.57~22.77 kDa, 保守结构域分子量范围 28.20~31.16 kDa, 其中双壳贝类 CK1 α 保守结构域分子量范围为 30.87~30.92 kDa, CK1 α like 保守结构域分子量范围为 30.87~30.99 kDa, CK1 δ 保守结构域分子量范围为 29.99~31.16 kDa,

CK1 γ 3 保守结构域分子量范围为 28.2~29.97 kDa, 是保守结构域分子量最小的家族成员(图 2)。各 CK1 蛋白的序列存在差异, 但它们的蛋白质三级结构具有相似性(图 3)。

2.2 双壳贝类 *CK1* 基因家族的系统发生分析

为了确定双壳贝类 *CK1* 基因的系统发生关系, 我们构建了 15 种物种的 *CK1* 系统发生树(图 4)。系统发育分析表明, 所有的 *CK1* 基因被细分为 7 个成员

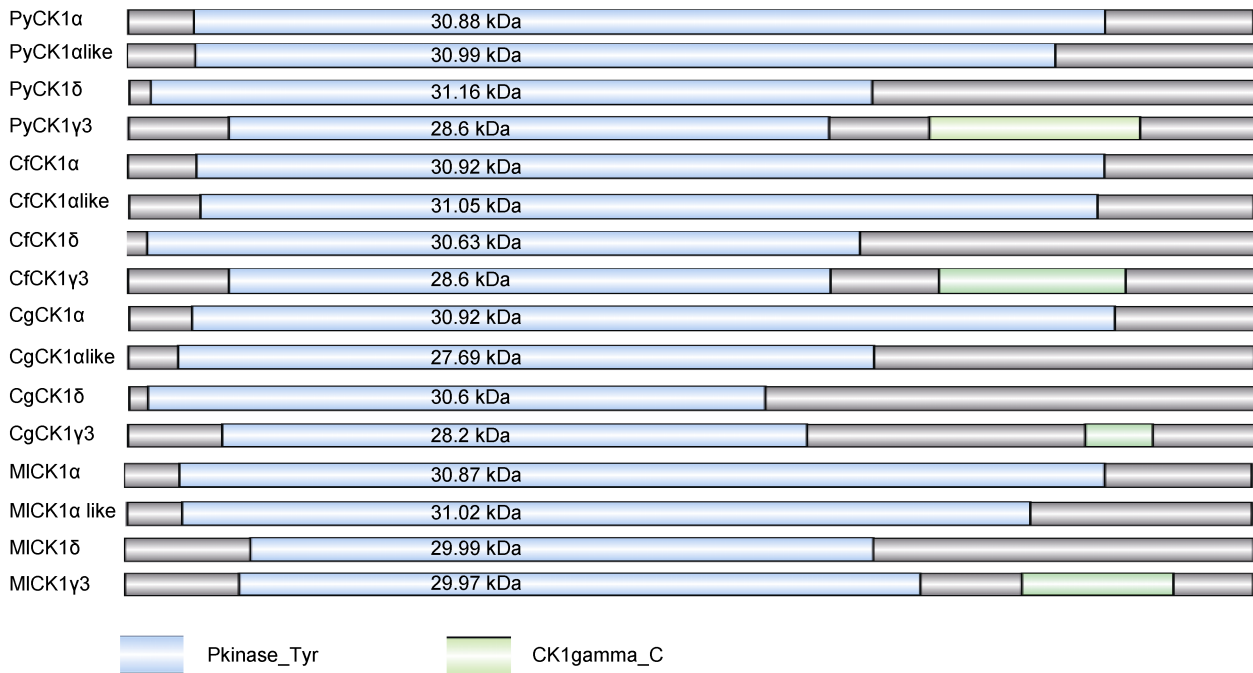


图 2 双壳贝类 CK1 蛋白结构域

Fig.2 Structure of CK1 proteins in four bivalve species

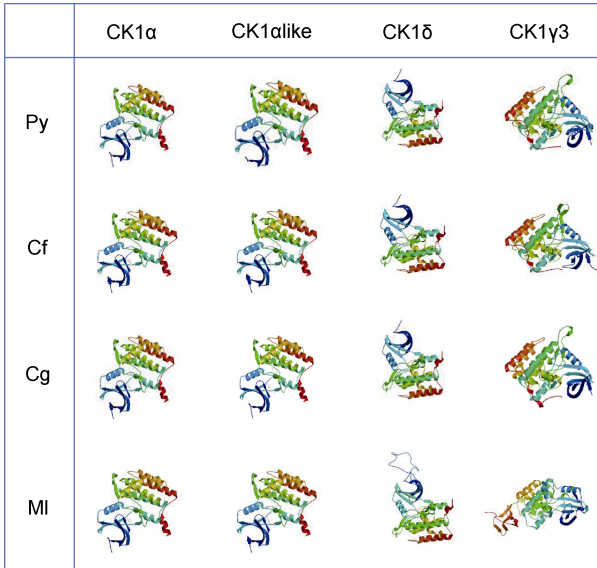


图3 双壳贝类 CK1 蛋白三级结构预测

Fig.3 Tertiary structure prediction of CK1 proteins in four bivalve species

簇, 包括 *CK1 α* , *CK1 α like*, *CK1 δ* , *CK1 ϵ* , *CK1 γ 1*, *CK1 γ 2*, *CK1 γ 3*, 且都按照成员分类聚在一起。在每个成员聚类过程中, 原口动物与后口动物分别产生了独立进化枝, 其中在软体动物形成的相对独立的进化枝中, 虾夷扇贝的 *CK1* 基因和栉孔扇贝的 *CK1* 基因都具有最近的亲缘关系, 同时与长牡蛎、侏儒蛤存在相对较近的亲缘关系, 符合物种之间的系统发生关系。

2.3 双壳贝类 *CK1* 基因家族时空表达分析

基于双壳贝类胚胎发育各时期的转录组数据分析(图 5a), 所有双壳贝类 *CK1* 基因均在担轮幼虫时期之前呈现出不同水平的高表达。其中 *PyCK1 α like*、*PyCK1 δ* 、*PyCK1 γ 3*、*CfCK1 δ* 、*CfCK1 γ 3*、*CgCK1 δ* 、*CgCK1 γ 3*、*MICK1 α* 、*MICK1 δ* 、*MICK1 γ 3*, 主要在受精卵到多细胞期具有相对较高的表达量, 并在囊胚期的表达量下降; *CgCK1 α* 、*MICK1 α like* 在多细胞期开始具有较高的表达量, *CgCK1 α* 在原肠胚期表达量开始下降, 而 *MICK1 α like* 在囊胚和原肠胚期的表达量相对较低, 在担轮幼虫期表达量再次上升; *PyCK1 α* 、*CfCK1 α* 在囊胚期至担轮幼虫期具有相对较高的表达量, 其中原肠胚时期达到最高, 从担轮幼虫期开始其表达量开始逐渐下降; *CfCK1 α like*、*CgCK1 α like* 从囊胚到担轮幼虫期有相对较高的表达量, 在原肠胚时期具有最高表达量。

对 *CK1* 家族基因在双壳贝类成体组织中的表达分析显示(图 5b), 不同的基因在成体组织中的表达模

式较为多样, 其中 *PyCK1 α like*、*PyCK1 δ* 、*PyCK1 γ 3*、*CfCK1 α like*、*CfCK1 δ* 、*CgCK1 δ* 、*CgCK1 γ 3*、*MICK1 α like*、*MICK1 δ* 、*MICK1 γ 3* 在双壳贝类的鳃中表达量明显高于其他组织。另外 *PyCK1 α* 、*CfCK1 α* 、*CfCK1 γ 3*、*CgCK1 α* 和 *MICK1 α* 表达模式相似, 均在双壳贝类的雄性性腺中具有最高的表达量。而值得注意的是, *CgCK1 α like* 在长牡蛎的肌肉中具有最高的表达量。

2.4 双壳贝类胚胎发育基因共表达网络及功能富集

我们构建了虾夷扇贝、栉孔扇贝、长牡蛎和侏儒蛤个体发育时期的基因共表达网络(图 6a), 网络模块数目分别为 12、14、9 和 10 个, 将模块中的前 10% 连通度的基因定义为关键基因。在虾夷扇贝中 *PyCK1 α like*、*PyCK1 δ* 和 *PyCK1 γ 3* 划分在 turquoise 模块(PyM1), 其中 *PyCK1 δ* 是该模块的关键基因, *PyCK1 α* 在 yellow 模块(PyM2); 在栉孔扇贝中 *CfCK1 α* 和 *CfCK1 α like* 在 brown 模块(CfM1), *CfCK1 δ* 和 *CfCK1 γ 3* 分别被划分至 yellow (CfM2) 和 pink (CfM3) 模块, 均为关键基因; 在长牡蛎中 *CgCK1 α* 和 *CgCK1 α like* 划分在 blue 模块(CgM1) 且为关键基因, *CgCK1 δ* 和 *CgCK1 γ 3* 在 yellow 模块(CgM2)。在侏儒蛤中 *MICK1 α* 、*MICK1 δ* 和 *MICK1 γ 3* 划分在 yellow 模块(MIM1), *MICK1 α like* 是侏儒蛤网络 turquoise 模块(MIM2) 的关键基因。对 *CK1* 为关键基因的模块(PyM1、CfM2、CfM3、CgM1、MIM2) 进行 KEGG 功能富集分析结果显示, *PyCK1 δ* 、*CfCK1 δ* 、*CgCK1 α* 和 *CgCK1 α like* 在胚胎发育时期除了 DNA 复制、RNA 转运和降解等基本生物过程, 还参与了碱基切除修复、核苷酸切除修复以及错配修复等与 DNA 损伤修复相关的过程。*CfCK1 γ 3* 主要参与了核糖体过程, *MICK1 α like* 参与调控蛋白质转运、MAPK 信号通路、钙信号通路和 Wnt 信号通路。

2.5 高温应激条件下 *CK1* 的表达分析

本研究采用 qPCR 方法, 在虾夷扇贝受到高温应激后 0、3、6、12 和 24 h 检测鳃中 *CK1* 基因的表达水平变化(图 7), 其中误差线表示平均值 \pm SE ($n=6$)。结果显示, *PyCK1 α* 、*PyCK1 α like* 和 *PyCK1 δ* 在高温应激后总体表达趋势相似, 均在应激 3 h 时显著上调(分别为 0 h 的 1.08、1.50、2.39 倍, $P<0.05$), *PyCK1 α* 在应激 6 h 时持续上调达到最高值, 随后表达量开始下降并于 24 h 时显著低于 0 h ($P<0.05$)。而 *PyCK1 α like* 和 *PyCK1 δ* 从应激 3 h 后表达量开始有所下降, 12 h 和 24 h 时相对表达量均低于 0 h, 在 24 h 时下调最为显著(*PyCK1 α like* $P<0.05$, *PyCK1 δ* $P<0.01$)。值得注意的是 *PyCK1 γ 3* 显示出不同的响应模式, 在应激后不

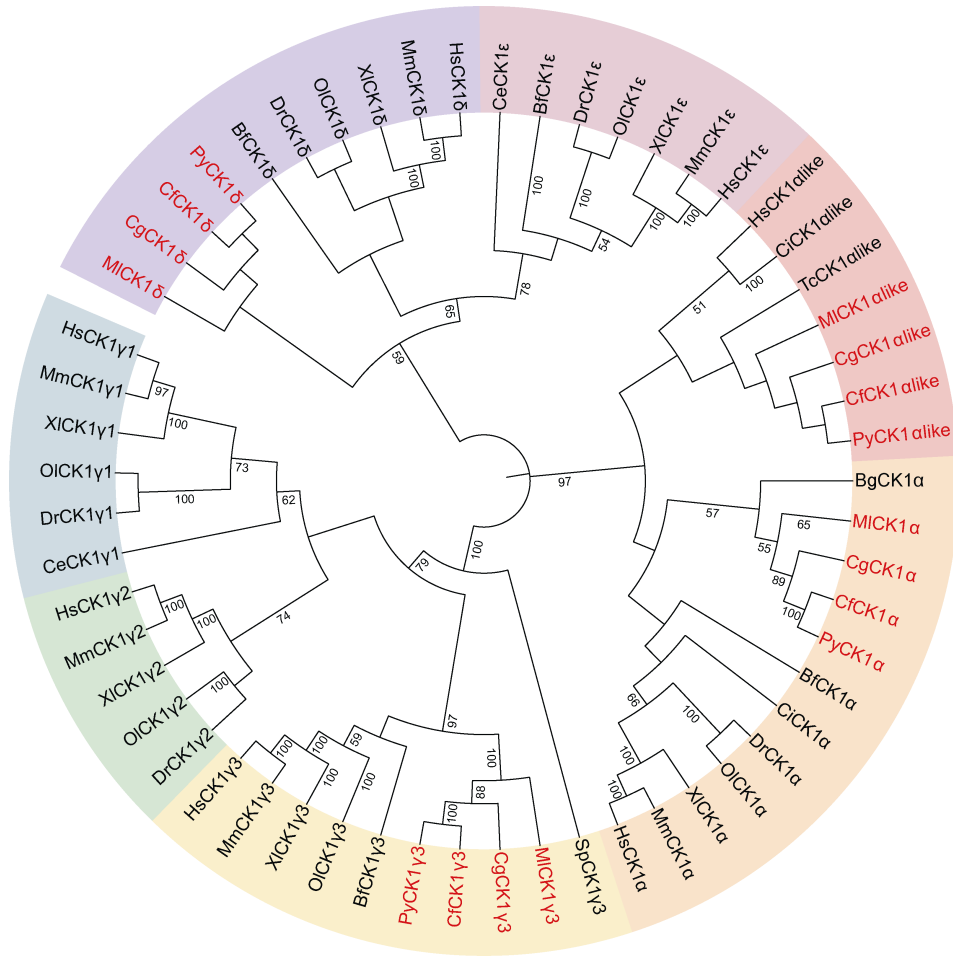


图 4 *CKI* 基因家族系统发生树

Fig.4 The phylogenetic tree of *CKI* gene family

注: 不同颜色范围代表不同的 *CKI* 成员。Hs: 人; Mm: 小鼠, Xl: 非洲爪蟾; Ol: 青鳉鱼; Dr: 斑马鱼; Ci: 海鞘; Bf: 文昌鱼; Py: 虾夷扇贝; Cf: 栉孔扇贝; Cg: 长牡蛎; Ml: 侏儒蛤; Bg: 光滑双脐螺; Tc: 赤拟谷盗; Ce: 秀丽隐杆线虫; Sp: 柱状珊瑚

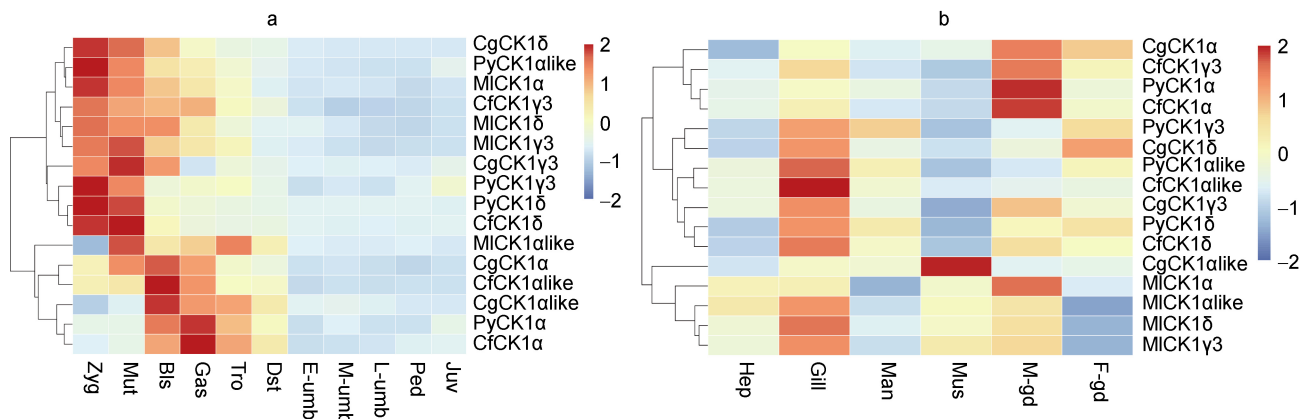


图 5 双壳贝类 *CKI* 基因家族时空表达谱

Fig.5 Spatio-temporal expression profiles of *CKI* family genes in four bivalve species

注: a. 双壳贝类 *CKI* 基因家族各胚胎发育时期表达谱; b. 双壳贝类 *CKI* 基因家族成体组织表达谱。Zyg: 受精卵; Mut: 多细胞; Bls: 囊胚期; Gas: 原肠胚期; Tro: 担轮幼虫期; Dst: D 型幼虫期; E-umb: 壳顶幼虫前期; M-umb: 壳顶幼虫中期; L-umb: 壳顶幼虫后期; Ped: 匍匐幼虫期; Juv: 稚贝。Hep: 肝胰腺; Gill: 鳃; Man: 外套膜; Mus: 肌肉; M-gd: 雄性性腺; F-gd: 雌性性腺

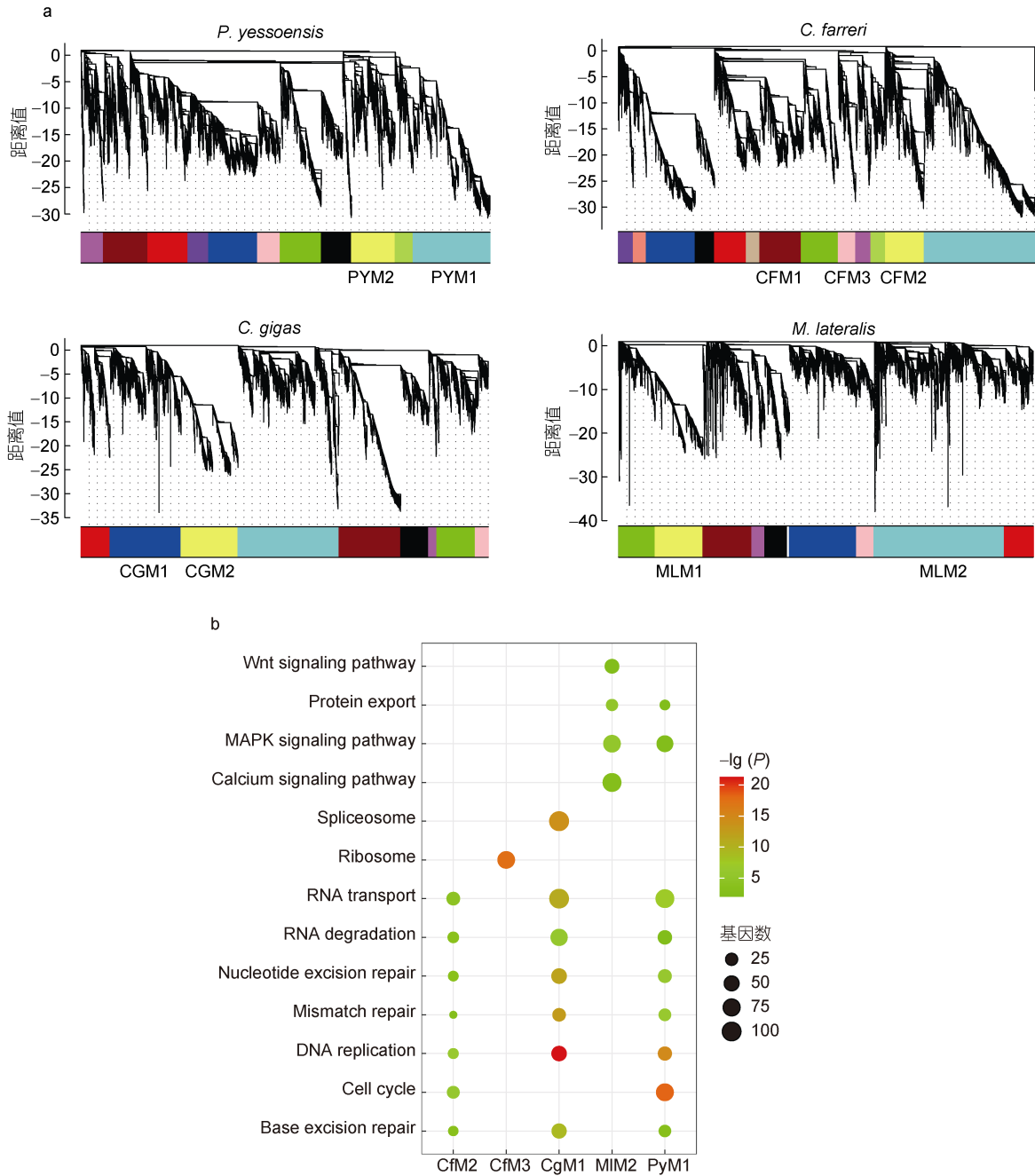


图 6 双壳贝类个体发育的基因共表达网络及 KEGG 富集
 Fig.6 Gene co-expression network and KEGG enrichment in individual development
 注: a. 双壳贝类个体发育的基因共表达网络, b. *CK1* 相关关键模块 KEGG 富集

同时时间点的相对表达量均呈现了下调趋势, 3 h、6 h、12 h 和 24 h 的相对表达量均低于 0 h, 并在 12 h 和 24 h 时显著下调($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究联合基因组和转录组数据对 4 种双壳贝类 *CK1* 基因家族进行了全基因组鉴定, 并探究了其

时空表达特征和高温应激条件下的表达规律。双壳贝类 *CK1* 基因均在担轮幼虫时期之前有相对较高的表达, 其中 *PyCK1alike*、*PyCK1δ*、*PyCK1γ3*、*CfCK1δ*、*CfCK1γ3*、*CgCK1δ*、*CgCK1γ3*、*MICK1α*、*MICK1δ*、*MICK1γ3* 在受精卵中呈现相对较高的表达量, 可能是来自于母源性 mRNA, 并在囊胚或原肠胚时期基本降解完全; *PyCK1α*、*CfCK1α*、*CfCK1alike*、*CgCK1α*、

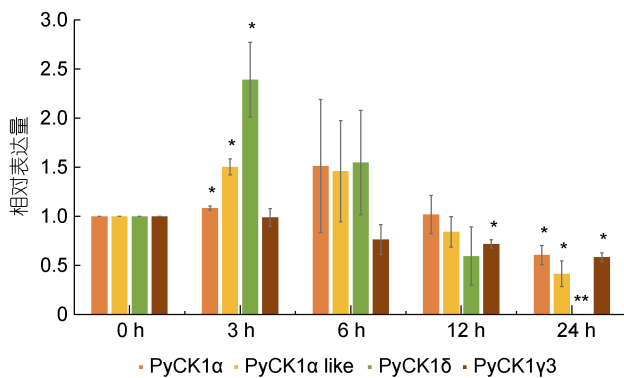


图7 高温应激后 *CKI* 基因在虾夷扇贝鳃中表达情况
Fig.7 Gene expression profiling of *CKI* genes in the gill after heat stress treatment
注: 竖线表示平均值±SE(n=6); *表示差异显著($P<0.05$); **表示差异极显著($P<0.01$)

CgCK1alike、*MICK1alike* 在多细胞或囊胚时期开始具有相对较高的表达量, 具有合子表达特征。Albornoz 等(2007)在研究 *CKI* 基因家族在斑马鱼胚胎发育时期的表达模式中也发现类似规律, 除了 *CK1ε*, 其他 *CKI* 基因在胚胎发育的早期阶段普遍表达, 并且具有母源和合子表达的特征。

PyCK1δ、*CfCK1δ*、*CgCK1α*、*CgCK1alike* 显著富集到修复 DNA 损伤的相关通路, 暗示了双壳贝类胚胎早期细胞分裂与 DNA 复制活动旺盛, *CKI* 家族基因的高表达可能对于其维持正常细胞周期活动、DNA 修复等具有重要作用。Puigvert 等(2013)研究发现 *CK1α* 可以通过磷酸化作用调控促凋亡和抗凋亡信号途径竞争以响应 DNA 损伤来调节细胞存活。另外, *CK1δ* 在 DNA 修复和细胞周期调节中起着重要作用 (Knippschild *et al*, 2014), Greer 等(2017)研究发现 *CK1δ* 的表达有助于 DNA 损伤的有效修复和维持有丝分裂检查点的正常功能。另外有研究表明, *CK1α* 可以通过磷酸化 Wnt 受体相关蛋白 Dvl 增加与 Wnt 受体的亲和力来完成对细胞行为和细胞命运的严格控制, 从而维持正常的胚胎发育 (Cruciat, 2014; Banerjee *et al*, 2019; Lau *et al*, 2019)。而 *MICK1alike* 在 Wnt 相关通路的显著富集也印证了以上发现。

在成体组织中, *PyCK1alike*、*PyCK1δ*、*PyCK1γ3*、*CfCK1alike*、*CfCK1δ*、*CgCK1δ*、*CgCK1γ3*、*MICK1alike*、*MICK1δ* 和 *MICK1γ3* 在鳃中有较高的表达。纤毛是双壳贝类动物的鳃行使呼吸、营养吸收等重要生理功能的结构基础 (Gómez-Mendikute *et al*, 2005)。有研究表明, *CKI* 激酶能够通过调节 II dynein

的保守调节因子维持纤毛的正常活动 (Fu *et al*, 2018)。*CKI* 在双壳贝类鳃中普遍的高表达现象可能对维持其纤毛的正常生理活动有重要的作用。另一方面, *CKI* 基因家族在细胞应激反应中具有突出贡献, 双壳贝类生存环境复杂, 鳃丝作为双壳贝类与外界直接接触的器官之一, 外界的有害刺激会直接影响鳃细胞的状态和活力 (Nogueira *et al*, 2013)。故推测 *CKI* 在鳃中的高表达可能对于其抵御外界不良刺激具有重要的意义。*PyCK1α*、*CfCK1α*、*CfCK1γ3*、*CgCK1α* 和 *MICK1α* 在雄性性腺中具有最高的表达量。有研究表明, *CKI* 可以通过磷酸化作用促进减数分裂过程同源重组 (Sakuno *et al*, 2015)。它们可能在双壳贝类精子的减数分裂过程中调节染色体行为。值得注意的是, 虽然 4 种双壳贝类之间整体 *CKI* 基因的表达趋势相似, 但仍存在强烈的物种特异性, 这可能反映了 4 个物种的适应性差异。例如, 虽然 *CgCK1alike* 在长牡蛎肌肉中表达最高, 但在其他贝类的肌肉中几乎没有表达。这可能与长牡蛎在潮间带中的附着生活方式密切相关, *CgCK1alike* 或参与氧化应激反应以避免肌肉萎缩 (Oh *et al*, 2021)。

Nielsen 等(2021)通过对北极潮间带贻贝 (*Mytilus edulis*) 高温应激实验明确了高温可以激发细胞产生热休克蛋白以增加细胞抵抗能力, Muller 等(2013)发现 *CKI* 基因可以磷酸化 Hsp70 和 Hsp90 维持细胞蛋白的折叠和降解的平衡。这或许暗示着 *PyCK1α*、*PyCK1alike* 和 *PyCK1δ* 参与磷酸化热激蛋白来响应高温应激反应。另一方面, 也有研究表明高温应激会导致 DNA 损伤 (Cheng *et al*, 2018), *PyCK1α*、*PyCK1alike* 和 *PyCK1δ* 可能参与高温应激引起的 DNA 损伤反应。有研究表明, *CK1γ3* 活性的下降, 能够减少细胞坏死性凋亡 (Lee *et al*, 2019), 故推测 *PyCK1γ3* 在高温应激条件下的表达下调, 有利于维持鳃细胞的稳态从而避免细胞发生坏死性凋亡。持续的高温应激条件下, 会使虾夷扇贝的细胞生存状态遭到破坏, *PyCKI* 表达量开始下降。以上结果暗示了 *CKI* 是参与细胞应激反应的重要基因, 参与了虾夷扇贝处于高温环境时的应激反应。

4 结论

本研究首次系统鉴定了虾夷扇贝、栉孔扇贝、长牡蛎和侏儒蛤 4 种双壳贝类中的 *CKI* 基因, 包括 *CK1α*、*CK1alike*、*CK1δ* 和 *CK1γ3*, 并全面分析了其蛋白结构、蛋白质性质以及系统发生关系。通过胚胎、

组织转录组分析和高温应激实验探究了双壳贝类 *CKI* 基因家族的时空表达和高温应激条件下的表达规律。结果表明, 双壳贝类 *CKI* 可能参与维持早期胚胎发育的基因组稳定性和成体组织稳态。此外, *CKI* 基因家族在高温应激反应中的潜在响应机制也得到了细致的描述。本研究结果为更好地理解双壳贝类动物 *CKI* 基因家族的进化关系、发育调节和应激反应机制奠定重要研究基础。

参 考 文 献

- ALBORNOZ A, YÁÑEZ J M, FOERSTER C, *et al*, 2007. The *CKI* gene family: expression patterning in zebrafish development [J]. *Biological Research*, 40(2): 251-266.
- ALTSCHUL S F, GISH W, MILLER W, *et al*, 1990. Basic local alignment search tool [J]. *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403-410.
- BANERJEE A, JOTHIMANI G, PRASAD S V, *et al*, 2019. Targeting wnt signaling through small molecules in governing stem cell fate and diseases [J]. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 19(3): 233-246.
- CHENG C H, GUO Z X, LUO S W, *et al*, 2018. Effects of high temperature on biochemical parameters, oxidative stress, DNA damage and apoptosis of pufferfish (*Takifugu obscurus*) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 150: 190-198.
- CHEONG J K, VIRSHUP D M, 2011. Casein kinase 1: complexity in the family [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(4): 465-469.
- CRUCIAT C M, 2014. Casein kinase 1 and Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 31: 46-55.
- FLOTOW H, GRAVES P R, WANG A Q, *et al*, 1990. Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase I action [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(24): 14264-14269.
- FU G, WANG Q, PHAN N, *et al*, 2018. The 11 dynein-associated tether and tether head complex is a conserved regulator of ciliary motility [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 29(9): 1048-1059.
- FULCHER L J, SAPKOTA G P, 2020. Functions and regulation of the serine/threonine protein kinase CK1 family: moving beyond promiscuity [J]. *Biochemical Journal*, 477(23): 4603-4621.
- GÓMEZ-MENDIKUTE A, ELIZONDO M, VENIER P, *et al*, 2005. Characterization of mussel gill cells in vivo and in vitro [J]. *Cell and Tissue Research*, 321(1): 131-140.
- GREER Y E, GAO B, YANG Y Z, *et al*, 2017. Lack of casein kinase 1 delta promotes genomic instability - The accumulation of DNA damage and down-regulation of checkpoint kinase 1 [J]. *PLoS One*, 12(1): e0170903.
- GROSS S D, ANDERSON R A, 1998. Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family [J]. *Cellular Signalling*, 10(10): 699-711.
- HIRST N L, NEBEL J C, LAWTON S P, *et al*, 2020. Deep phosphoproteome analysis of *Schistosoma mansoni* leads development of a kinomic array that highlights sex-biased differences in adult worm protein phosphorylation [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(3): e0008115.
- HU X L, BAO Z M, HU J J, *et al*, 2006. Cloning and characterization of tryptophan 2, 3-dioxygenase gene of Zhikong scallop *Chlamys farreri* (Jones and Preston 1904)[J]. *Aquaculture Research*, 37(12): 1187-1194.
- HUART A S, MACLAINE N J, MEEK D W, *et al*, 2009. *CKI* plays a central role in mediating MDM2 control of p53 and E2F-1 protein stability [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 284(47): 32384-32394.
- KALOUSHI A, MYLONIS I, POLITOU A S, *et al*, 2010. Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1 [J]. *Journal of Cell Science*, 123(17): 2976-2986.
- KNIPPSCHILD U, GOCHT A, WOLFF S, *et al*, 2005. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes [J]. *Cellular Signalling*, 17(6): 675-689.
- KNIPPSCHILD U, KRÜGER M, RICHTER J, *et al*, 2014. The *CKI* family: contribution to cellular stress response and its role in carcinogenesis [J]. *Frontiers in Oncology*, 4: 96.
- KNIPPSCHILD U, MILNE D M, CAMPBELL L E, *et al*, 1997. p53 is phosphorylated *in vitro* and *in vivo* by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase 1 delta in response to topoisomerase-directed drugs [J]. *Oncogene*, 15(14): 1727-1736.
- KRÖBER-BONCARDO C, LORENZEN S, BRINKER C, *et al*, 2020. Casein kinase 1.2 over expression restores stress resistance to *Leishmania donovani* HSP23 null mutants [J]. *Scientific Reports*, 10(1): 15969.
- KUMAR S, STECHER G, TAMURA K, 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870-1874.
- LANGFELDER P, HORVATH S, 2008. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis [J]. *BMC Bioinformatics*, 9: 559.
- LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, *et al*, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 23(21): 2947-2948.
- LAU S T, LI Z X, LAI F P, *et al*, 2019. Activation of hedgehog signaling promotes development of mouse and human enteric neural crest cells, based on single-cell transcriptome analyses [J]. *Gastroenterology*, 157(6): 1556-1571.e5.
- LEE S Y, KIM H, LI C M, *et al*, 2019. Casein kinase-1 γ 1 and 3 stimulate tumor necrosis factor-induced necroptosis through RIPK3 [J]. *Cell Death & Disease*, 10(12): 923.
- LETUNIC I, KHEDKAR S, BORK P, 2021. SMART: recent updates, new developments and status in 2020 [J]. *Nucleic Acids Research*, 49(D1): D458-D460.
- LI Y L, SUN X Q, HU X L, *et al*, 2017. Scallop genome reveals molecular adaptations to semi-sessile life and neurotoxins [J]. *Nature Communications*, 8(1): 1721.
- LI Y P, ZHANG L L, SUN Y, *et al*, 2016. Transcriptome sequencing and comparative analysis of ovary and testis identifies potential key sex-related genes and pathways in scallop *Patinopecten yessoensis* [J]. *Marine Biotechnology*,

- 18(4): 453-465.
- LIU W Z, XIE Y B, MA J Y, *et al*, 2015. IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences [J]. *Bioinformatics*, 31(20): 3359-3361.
- MACLAINE N J, ØSTER B, BUNDGAARD B, *et al*, 2008. A central role for *CKI* in catalyzing phosphorylation of the p53 transactivation domain at serine 20 after HHV-6B viral infection [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 283(42): 28563-28573.
- MANNING G, PLOWMAN G D, HUNTER T, *et al*, 2002a. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(10): 514-520.
- MANNING G, WHYTE D B, MARTINEZ R, *et al*, 2002b. The protein kinase complement of the human genome [J]. *Science*, 298(5600): 1912-1934.
- MEGGIO F, PERICH J W, MARIN O, *et al*, 1992. The comparative efficiencies of the Ser(P)-, Thr(P)- and Tyr(P)-residues as specificity determinants for casein kinase-1 [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 182(3): 1460-1465.
- MINIA I, CLAYTON C, 2016. Regulating a post-transcriptional regulator: protein phosphorylation, degradation and translational blockage in control of the trypanosome stress-response RNA-binding protein ZC3H11 [J]. *PLoS Pathogens*, 12(3): e1005514.
- MULLER P, RUCKOVA E, HALADA P, *et al*, 2013. C-terminal phosphorylation of Hsp70 and Hsp90 regulates alternate binding to co-chaperones CHIP and HOP to determine cellular protein folding/degradation balances [J]. *Oncogene*, 32(25): 3101-3110.
- NIELSEN M B, VOGENSEN T K, THYRRING J, *et al*, 2021. Freshening increases the susceptibility to heat stress in intertidal mussels (*Mytilus edulis*) from the Arctic [J]. *Journal of Animal Ecology*, 90(6): 1515-1524.
- NOGUEIRA L S, WOOD C M, GILLIS P L, *et al*, 2013. Isolation and fractionation of gill cells from freshwater (*Lasmigona costata*) and seawater (*Mesodesma mactroides*) bivalves for use in toxicological studies with copper [J]. *Cytotechnology*, 65(5): 773-783.
- OH S, CHOI C H, LEE B J, *et al*, 2021. Fermented oyster extract attenuated dexamethasone-induced muscle atrophy by decreasing oxidative stress [J]. *Molecules*, 26(23): 7128.
- PUIGVERT J C, VON STECHOW L, SIDDAPPA R, *et al*, 2013. Systems biology approach identifies the kinase Csnk1a1 as a regulator of the DNA damage response in embryonic stem cells [J]. *Science Signaling*, 6(259): ra5.
- SAID R M, NASSAR S E, 2022. Mortality, energy reserves, and oxidative stress responses of three native freshwater mussels to temperature as an indicator of potential impacts of climate change: a laboratory experimental approach [J]. *Journal of Thermal Biology*, 104: 103154.
- SAKUNO T, WATANABE Y, 2015. Phosphorylation of cohesin Rec11/SA3 by casein kinase 1 promotes homologous recombination by assembling the meiotic chromosome axis [J]. *Developmental Cell*, 32(2): 220-230.
- SANTERRE C, SOURDAINE P, MARC N, *et al*, 2013. Oyster sex determination is influenced by temperature - First clues in spat during first gonadic differentiation and gametogenesis [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 165(1): 61-69.
- WANG S, ZHANG J B, JIAO W Q, *et al*, 2017. Scallop genome provides insights into evolution of bilaterian karyotype and development [J]. *Nature Ecology & Evolution*, 1(5): 0120.
- WILKINS M R, GASTEIGER E, BAIROCH A, *et al*, 1999. Protein identification and analysis tools in the ExpASY server [M] // LINK A J. *2-D Proteome Analysis Protocols*. Totowa: Humana Press: 531-552.
- WINTER M, MILNE D, DIAS S, *et al*, 2004. Protein kinase CK1 δ phosphorylates key sites in the acidic domain of murine double-minute clone 2 protein (MDM2) that regulate p53 turnover [J]. *Biochemistry*, 43(51): 16356-16364.
- XU P F, IANES C, GÄRTNER F, *et al*, 2019. Structure, regulation, and (patho-)physiological functions of the stress-induced protein kinase CK1 delta (CSNK1D) [J]. *Gene*, 715: 144005.
- ZELENAK C, EBERHARD M, JILANI K, *et al*, 2012. Protein kinase CK1 α regulates erythrocyte survival [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 29(1/2): 171-180.
- ZHANG G F, FANG X D, GUO X M, *et al*, 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation [J]. *Nature*, 490(7418): 49-54.

GENOME-WIDE IDENTIFICATION AND EXPRESSION PROFILING OF THE *CKI* GENE FAMILY IN BIVALVES

SUN Feng-Zhi¹, LYU Zhen-Li¹, LIU Fu-Yun¹, XING Qiang¹, LIAN Shan-Shan¹,
WANG Shi^{1,2,3}, BAO Li-Sui⁴

(1. Ministry of Education (MOE) Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Laoshan Laboratory, Qingdao 266237, China; 3. Laboratory of Tropical Marine Germplasm Resources and Breeding Engineering, Ocean University of China, Sanya 572000, China; 4. Institute of Evolution & Marine Biodiversity, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract The casein kinase 1 (*CKI*) gene family is an important family of protein kinases with complex and diverse regulatory roles in important biological processes such as DNA damage response and repair, cell proliferation and apoptosis, and embryonic development and homeostasis. To understand the characteristics, evolution, and biological function of the *CKI* gene family in bivalve species, we conducted the genome-wide identification and functional and evolutionary analysis of the *CKI* gene family in bivalve. We also investigated the expression profiling of the *CKI* gene family under heat stress. The genome-wide characterization revealed that *CKI α* , *CKI α like*, *CKI δ* , and *CKI γ 3* were present and *CKI ϵ* , *CKI γ 1*, and *CKI γ 2* were found lost in *P. yessoensis*, *C. farreri*, *C. gigas*, and *M. lateralis*. Spatiotemporal expression analysis revealed that all *CKI* genes in bivalve were expressed in mainly the early embryonic development and showed a maternal/zygotic specific expression pattern at the multicellular/blastula stage; and the co-expression module of *CKI* as a key gene was significantly enriched in mismatch repair, nucleotide excision repair, and other related pathways, suggesting that *CKI* genes are potentially involved in regulating DNA damage repair during bivalve embryonic development, thus to maintain the genomic integrity during embryonic development. The *CKI* genes in bivalve showed different expression patterns in adult tissues, mainly in gill and male gonad with relatively high expression. After heat stress on *P. yessoensis*, *PyCKI α* , *PyCKI α like*, and *PyCKI δ* were significantly up-regulated in the first 3 h and then tended to be down-regulated after 12 h, while *PyCKI γ 3* showed a different downward trend at different time points of heat stress. These results indicate that bivalve *CKI* genes are involved in the response to heat stress. This study contributes to the understanding of the function and evolution of bivalve *CKI* genes and lays a foundation for further investigating the mechanisms of homeostasis maintenance during embryonic development and stress regulation in bivalve species.

Key words bivalve; *CKI* gene family; gene identification; expression analysis; heat stress