

网络出版时间:2013-11-21 17:28
网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20131121.1728.013.html>

扶桑绵粉蚧钙调蛋白基因的原核表达与表达谱分析

罗 梅,宾淑英,林进添
(仲恺农业工程学院 外来有害生物预警与控制研究所,广东 广州 510225)

【摘 要】 【目的】探究我国重要入侵生物扶桑绵粉蚧(*Phenacoccus solenopsis* Tinsley)钙调蛋白基因(*PsCam*)在各虫态中的表达差异及 *PsCam* 蛋白在体外的异源表达,为进一步揭示 *PsCam* 的生理功能提供参考。【方法】克隆 *PsCam* 基因的 ORF,推导其编码的氨基酸序列,采用生物信息学方法,分析扶桑绵粉蚧钙调蛋白的结构。构建 *PsCam* 原核表达载体,将其转化到大肠杆菌中进行诱导表达,并对产物进行纯化。采用实时荧光 PCR 方法,分析该基因在扶桑绵粉蚧各个虫态中的相对表达量。【结果】扶桑绵粉蚧钙调蛋白基因的氨基酸序列分析结果显示,该蛋白没有信号肽,具有 2 个 EF-hand 钙结合结构域,有 13 个 Ca^{2+} 结合位点。成功构建了原核表达载体 pET28a-*PsCam*,经诱导表达后获得了重组的 *Cam* 蛋白,目的蛋白的分子质量约为 17 ku。 *PsCam* mRNA 在不同虫态的扶桑绵粉蚧中都有表达,在成熟雌虫中的表达量最低,在 1 龄幼虫中的表达量最高,是成熟雌虫的 7.1 倍。【结论】在原核表达系统中诱导表达了重组 *PsCam* 蛋白; *PsCam* 基因在扶桑绵粉蚧不同虫态中差异表达。

【关键词】 扶桑绵粉蚧;钙调蛋白;基因表达谱;原核表达
【中图分类号】 Q969.36+9.4 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-9387(2013)12-0138-05

Prokaryotic expression and expression profiling of calmodulin genes in mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae)

LUO Mei, BIN Shu-ying, LIN Jin-tian
(Institute for Management of Invasive Alien Species, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225, China)

Abstract: 【Objective】 The research investigated the expression of calmodulin gene in *Phenacoccus solenopsis* (*PsCam*) at different developmental stages and its heterologous expression in vitro to improve the further exploration of its physiological function. 【Method】 The ORF of *PsCam* was cloned, the amino acid sequence was derived, and its structure was analyzed using bioinformatics methods. The prokaryotic expression vector was constructed before being transformed into *E. coli* for expression and purification. Its relative expression levels at different instars were analyzed using real-time PCR. 【Result】 The amino acid sequence indicated that there were two EF-hand domains and 13 Ca^{2+} binding sites but no signal peptide in the protein of *PsCam*. The prokaryotic expression vector of pET28a-*PsCam* was successfully built. The relative molecular mass of the obtained protein after induced expression was approximately 17 ku. Expression of *PsCam* mRNA was observed in different instars of *P. solenopsis*. The expression in mature females was the lowest, while the expression in one year old instar larvae was the highest, which was 7.1 times of that in mature females. 【Conclusion】 *P. solenopsis* calmodulin protein was successfully expressed and the expression levels in different instars were different.

〔收稿日期〕 2013-01-13
〔基金项目〕 农业部公益性行业科研专项(201103026);仲恺农业工程学院科研基金项目(G3100004)
〔作者简介〕 罗 梅(1984—),女,广东南雄人,实验师,硕士,主要从事入侵生物研究。E-mail:08luomei@163.com
〔通信作者〕 林进添(1963—),男,广东阳江人,教授,主要从事昆虫行为调控研究。E-mail:linjintian@163.com

Key words: *Phenacoccus solenopsis*; calmodulin; gene expression profile; prokaryotic expression

扶桑绵粉蚧 (*Phenacoccus solenopsis* Tinsley) 隶属半翅目、粉蚧科、绵粉蚧亚科、绵粉蚧属 (*Phenacoccus*), 在中国被列为检疫性害虫, 其原产北美洲, 最早发现于美国新墨西哥州一个公园里的 2 种杂草类植物根部的热带火蚁 (*Solenopsis geminata*) 巢中^[1-2], 随后逐步扩展至美国的其他州以及南美洲、非洲、澳洲、欧洲和亚洲等地^[2-8]。扶桑绵粉蚧在我国最早于 2008-06 在广州园林植物扶桑上发现^[9], 之后于 2009-02 正式被列入《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》(农业部、国家质检总局第 1147 号公告)。扶桑绵粉蚧繁殖能力强, 能危害棉花、扶桑、向日葵、南瓜、番茄等多种重要的经济作物^[10]。1991 年, 在美国发现该虫危害棉花; 2005 年以来, 巴基斯坦、印度等地的棉花上该虫暴发成灾, 给当地的棉花种植业造成巨大的经济损失^[7-11]。在中国, 对扶桑绵粉蚧危害的风险分析表明, 该害虫在我国的风险危害性很大, 尤其是在长江中下游棉区和黄河中下游棉区危险性最大^[12]。该虫无论对常规棉还是 Bt 棉均可产生严重危害。截至 2010-04-26, 扶桑绵粉蚧已在我国 9 个省(自治区)的局部地区发现, 而且在江西九江永修进入棉田危害。

钙调蛋白 (Calmodulin, CaM) 是广泛存在于各种真核生物细胞中的多功能调节蛋白, 为钙离子 (Ca^{2+}) 的受体蛋白, 对生物体内多种 Ca^{2+} 依赖的细胞功能和酶体系都有重要的调节作用, 其对任何微量的钙都能敏感地捕获, 参与的生化反应很多。CaM 是细胞内 Ca^{2+} 信号传导途径中的主要信号转导分子, 介导调控由 Ca^{2+} 引起的一系列生理生化反应, 参与并调节细胞的增生、分化、运动等基本代谢过程, 通过激活下游靶蛋白调控基因转录、信号转导、肌肉收缩等生理过程^[13-14]。CaM 通常是以 Ca^{2+} -CaM 复合物形式参与调节细胞的各种活动^[15]。本研究通过荧光定量技术对扶桑绵粉蚧 *Cam* 基因 (*PsCam*) 在不同发育时期虫体中的相对表达量进行了分析, 并用原核表达的方法对 *PsCam* 进行了体外诱导表达与纯化, 旨在为进一步揭示 *PsCam* 的生理功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

扶桑绵粉蚧由仲恺农业工程学院外来有害生物预警与控制研究所温室用扶桑植株培养。取扶桑绵

粉蚧混合种群样品迅速放入液氮冷冻后保存于-70℃冰箱, 用于 *PsCam* 基因的克隆。根据朱艺勇等^[16]的方法, 用毛笔分别收集温室培养的扶桑绵粉蚧的卵、1 龄幼虫、2 龄幼虫、刚蜕皮的 3 龄幼虫及未交配的成熟雌虫, 液氮冷冻后保存于-70℃冰箱, 用于不同虫态 *PsCam* 基因的表达差异分析。

RNA 提取试剂盒购于 Qiagen 公司, pMD18-T 克隆载体、SYBR® Premix Ex Taq™、DL2000 DNA Marker、PrimeScript® RT reagent Kit 反转录系统、Ex Taq DNA 聚合酶均购于 TaKaRa 公司, 核酸琼脂糖凝胶回收试剂盒、感受态细胞 BL21 (DE3) 购于 TIANGEN 公司, pET28a 载体为本研究所保存。

1.2 扶桑绵粉蚧总 RNA 的提取和反转录

按照 RNA 提取试剂盒的使用说明提取扶桑绵粉蚧的总 RNA。经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后, 按照 PrimeScript® RT reagent Kit 反转录系统说明书反转录获得第一链 cDNA。

1.3 引物的设计与合成

根据笔者前期研究获得的 *PsCam* 基因序列^[17], 设计引物 F 和 R, 用于 *PsCam* 基因 ORF 的克隆; 设计引物 EF 和 ER, 用于原核表达分析; 同时, 设计 1 对引物 RTF 和 RTR, 用于 *PsCam* 基因的表达谱分析。引物在广州英骏生物技术有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 试验所用的 PCR 引物	
Table 1 PCR primers used in this study	
引物 Primer	序列(5'→3') Sequence(5'→3')
F	ATGGCTCATTATTTTCAGAG
R	TCAATAATAATCTGGAACAG
RTF	TTACTCAACTGGGGAGAGCAA
RTR	ACTCCATTCAAAGAGACATTGG
EF	<u>GAATTC</u> ATGGCTCATTATTTTCAGAG
ER	<u>CTCGAGT</u> CAATAATAATCTGGAACAGG
actin-F	GTCCCATCATCAGAGCAGTG
actin-R	CATCCCAGTTTCTACAATACCG

注: EF 和 ER 序列下划线部分分别为 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切位点。

Note: Underlined parts of EF and ER sequences are *Eco*R I and *Xho* I restriction enzyme sites, respectively.

1.4 *PsCam* 基因 ORF 的克隆

以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: 10×Ex Taq DNA 聚合酶反应缓冲液 5 μL (含 Mg^{2+}), 正向和反向引物 (F、R) 各 1 μL (10 μmol/L), 2.5 mmol/L dNTP 4 μL, Ex Taq DNA 聚合酶 0.25 μL (5 U/μL), 加灭菌超纯水至

50 μL 。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,回收目的片段。将回收产物连接至 pMD18-T 克隆载体后转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中,经蓝白斑和氨苄(Amp)抗性筛选,对重组质粒扩大培养,提取质粒 DNA,送广州英俊生物技术有限公司测序,推导其编码氨基酸序列,并进行生物信息学分析。

1.5 原核表达载体 pET28a-PsCam 的构建

以 1.4 中阳性克隆质粒为模板,用引物 EF 和 ER 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:质粒 1 μL , 10 $\times$ Ex Taq DNA 聚合酶反应缓冲液 5 μL (含 Mg^{2+}),正向和反向引物(EF、ER)各 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$),2.5 mmol/L dNTP 4 μL ,Ex Taq DNA 聚合酶 0.25 μL (5 U/ μL),加灭菌超纯水至 50 μL 。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 8 min。回收 PCR 扩增产物,用 EcoR I 和 Xho I 进行双酶切后,与同样双酶切的 pET28a 载体质粒进行连接。连接产物转化到 *E. coli* DH5 α 中,经蓝白斑试验筛选出阳性克隆,扩大培养后提取质粒。将重组的阳性质粒 pET28a-PsCam 转化到感受态细胞 BL21(DE3)中,涂板,挑单克隆进行 PCR 检测,并将阳性样品送广州英俊生物技术有限公司测序确认。

1.6 重组质粒 pET28a-PsCam 的原核表达及表达产物的纯化

将 1.6 中的 BL21(DE3)阳性克隆在 LB/Amp 培养基中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~1.0 时,加入

IPTG 至其浓度为 1 mmol/L 进行诱导表达,选取诱导 1,2,4 和 8 h 的菌体进行蛋白抽提。对抽提的菌体蛋白进行 150 g/L SDS-PAGE 电泳检测,并对蛋白进行纯化。蛋白纯化按照 Ni-NTA 纯化试剂盒说明书进行。将纯化产物分别稀释 10 和 50 倍,进行 150 g/L 的 SDS-PAGE 电泳检测。

1.7 PsCam 基因的表达谱分析

以 *actin* 基因(引物见表 1)作为内参基因,采用实时荧光定量 PCR 方法检测 *PsCam* 在不同虫态的表达谱。荧光定量 PCR 采用 25 μL 体系:12.5 μL SYBR 预混液,10 $\mu\text{mol/L}$ 的上、下游引物各 1 μL ,cDNA 模板 1 μL ,灭菌超纯水 9.5 μL ,混匀后离心。每个样品重复 3 次。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,接着进行 40 个循环,每个循环采用两步法:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;1 个循环的解离:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。PCR 使用的仪器为 Bio-Rad 公司的 iQ5。反应结束后收集循环阈值(*Ct* 值),采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[18]进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 PsCam 基因 ORF 的克隆

PsCam 的 ORF 长度为 447 bp,编码 148 个氨基酸。用在线软件 SignalP 4.0 分析 *PsCam* 氨基酸序列信号肽剪切位点,结果显示该蛋白没有信号肽。功能域分析显示,该蛋白有 2 个 EF-hand 钙结合结构域(图 1),有 13 个 Ca^{2+} 结合位点。用 Protparam 工具对该基因编码蛋白的分子质量进行预测,结果显示其分子质量为 17 392.9 u。

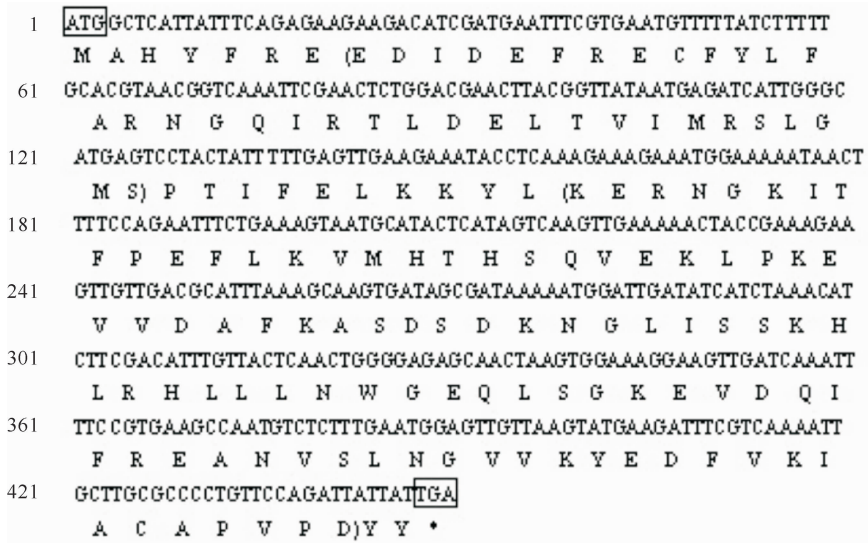


图 1 *PsCam* ORF 序列及推导的氨基酸序列特征

实线框分别代表起始密码子和终止密码子;括号内为 EF-hand 钙结合结构域

Fig. 1 Characteristics of ORF and derived protein sequence of *PsCam*

Solid line boxes show initiation codon and stop codon. Brackets show the EF-hand calcium-binding domain profiles

2.2 原核表达载体 pET28a-PsCam 的鉴定

对表达载体 pET28a-PsCam 进行 PCR 鉴定,结果获得了约 480 bp 的片段(图 2),与预期结果相符。表达载体 pET28a-PsCam 的测序结果表明,包含酶切位点为 459 bp 的片段已经成功克隆至 pET28a 表达载体。

2.3 原核表达载体 pET28a-PsCam 的诱导表达

试验结果(图 3)发现,重组菌在 17 ku 左右有明显的特异性条带产生,而未插入目的基因的空质粒在相应位置未出现特异性条带,推测 17 ku 的表达产物为目的融和蛋白。从图 3 还可以看出,随着诱导时间的延长,蛋白的表达量逐渐增大。

从图 4 可以看出,纯化的扶桑绵粉蚧的钙调蛋白分子质量约为 17 ku,这与诱导表达的结果一致,证明融合蛋白得到了有效表达,并得到有效的纯化分离。

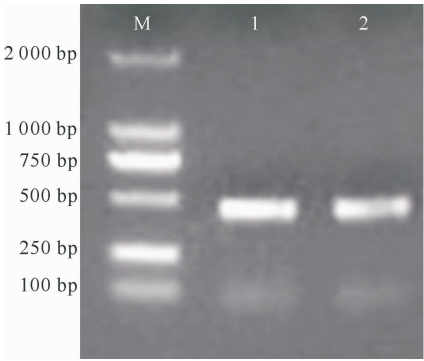


图 2 扶桑绵粉蚧钙调蛋白原核表达载体的 PCR 鉴定
M. DNA Marker;1,2. 原核表达载体 pET28a-PsCam PCR 产物

Fig. 2 PCR detection of constructed prokaryotic expression vector of PsCam
M. DNA Marker;1,2. PCR products of prokaryotic expression vector pET28a-PsCam

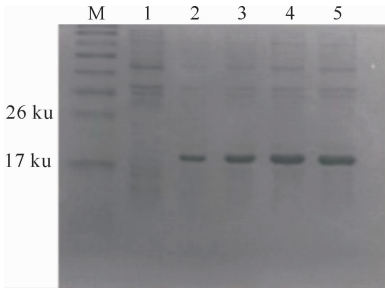


图 3 扶桑绵粉蚧重组蛋白 pET28a-PsCam 的诱导表达
M. 蛋白 Marker;1. pET28a 空载体诱导产物;
2~5. 分别为 pET28a-PsCam 诱导 1,2,4 和 8 h 的产物

Fig. 3 Induced expression of pET28a-PsCam
M. Protein marker;1. Expression product of empty vector pET28a;2-5. Induced products of pET28a-PsCam at 1,2,4, and 8 h

2.4 PsCam 基因的表达谱分析

以扶桑绵粉蚧成熟雌虫的 PsCam mRNA 含量为基准,对其不同虫态的 PsCam mRNA 含量进行分析,结果见图 5。

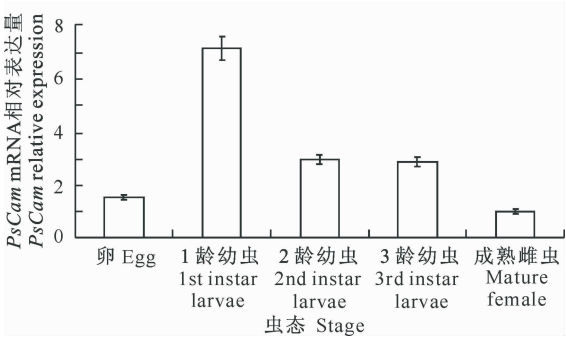


图 5 不同虫态扶桑绵粉蚧 PsCam mRNA 的表达谱
Fig. 5 Relative expression levels of PsCam mRNA in different states of Phenacoccus solenopsis

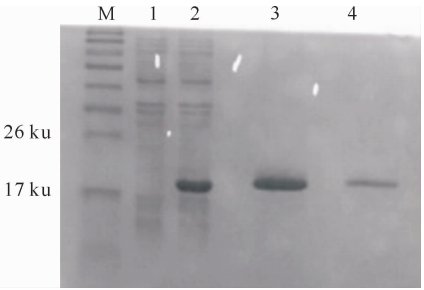


图 4 扶桑绵粉蚧重组蛋白 pET28a-PsCam 的 SDS-PAGE 分析
M. 蛋白 Marker;1. pET28a 空载体诱导产物;2. 纯化前的重组蛋白;3~4. 分别为纯化后稀释 10,50 倍的重组蛋白

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of reconstructed pET28a-PsCam
M. Protein Marker;1. Induced product of empty vector pET28a;2. pET28a-PsCam before purification;3-4. pET28a-PsCam diluted for 10 and 50 times after purification, respectively

由图 5 可知,PsCam mRNA 在不同虫态扶桑绵粉蚧中都有表达,但在 1 龄幼虫中的相对表达量最高,是其成熟雌虫的 7.1 倍;2 龄幼虫与 3 龄幼虫的相对表达量相当,是成熟雌虫的 2.9 倍左右;卵中的相对表达量是成熟雌虫的 1.54 倍;PsCam mRNA 在成熟雌虫中的表达量最低。

3 讨论

本研究利用 RT-PCR 的方法克隆了 PsCam 基因的 ORF,经分析,PsCAM 氨基酸序列信号肽剪切位点显示该蛋白没有信号肽,具有 2 个 EF-hand 钙结合结构域,分子质量为 17 392.9 u。EF-hand 通常成对或者是 2 个以上出现。配对的手之间可以相互沟通,EF 手之间显示出正向协同效应^[19]。钙离子结合钙调蛋白时可以诱导 EF-hand 的构象发生

变化,导致靶蛋白激活或者失活。本研究结果表明,扶桑绵粉蚧钙调蛋白具有 2 个 EF-hand,其之间是否具有正向协同效应及其如何影响该虫的生理变化,需要进一步研究。

CaM 可以与很多不同的蛋白质结合,从而影响细胞的功能。钙调素参与介导的生命活动进程有生理代谢、细胞凋亡、肌肉收缩、细胞内运动、神经生长以及免疫反应等。另有研究发现,钙调素可以在细胞核内发挥功能,其可能参与前 mRNA 的剪切和调控核糖体聚合及功能发挥^[20]。钙离子在细胞的信号传导体系中是重要的第二信使,许多钙调素结合蛋白本身不能结合钙离子,但其可以利用钙调素作为钙感应器和信号传导分子^[21]。*PsCam* mRNA 在扶桑绵粉蚧不同虫态中都有表达,但在各个虫态的表达量有差异,在成熟雌虫中的表达量最低,在 1 龄幼虫中的表达量是其成熟雌虫的 7.1 倍。*PsCam* 基因功能并不单一,其具体功能还有待进一步研究。

本研究成功地对扶桑绵粉蚧钙调蛋白进行了体外表达与纯化,下一步将研究纯化所得的蛋白对扶桑绵粉蚧生长发育及代谢的影响,为进一步探索钙调蛋白在扶桑绵粉蚧中的作用奠定基础。

[参考文献]

- [1] Tinsley J D. Notes on Coccidae, with descriptions of new species [J]. Can Entomol, 1989, 30: 317-320.
- [2] Cockerell T D A. Two new mealybugs from New Mexico [J]. Can Entomol, 1902, 34(2): 315-316.
- [3] Williams D J, Granara de Willink M C. Mealybugs of central and South America [M]. UK: CAB International Wallingford, 1992: 635.
- [4] Kosztarab M. Scale insects of Northeastern North America: Identification, biology, and distribution [M]. Martinsville, Virginia: Virginia Museum of Natural History, 1996: 499-501.
- [5] Williams D J. Mealybugs of Southern Asia [M]. London: The Natural History Museum, 2004: 896.
- [6] Culik M P, Gullan P J. A new pest of tomato and other records of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) from Espírito Santo, Brazil [J]. Zootaxa, 2005, 964: 1-8.
- [7] Hodgson C, Abbas G, Arief M J, et al. *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Sternorrhyncha: Coccoidea: Pseudococcidae), an invasive mealybug damaging cotton in Pakistan and India, with a discussion on seasonal morphological variation [J]. Zootaxa, 2008, 1913: 1-35.
- [8] Akintola A J, Ande A T. First record of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae) on *Hibiscus rosa-sinensis* in Nigeria [J]. Agric J, 2008, 3(1): 1-3.
- [9] 马 骏, 胡学难, 刘海军, 等. 广州扶桑上发现扶桑绵粉蚧 [J]. 植物检疫, 2009, 3(2): 35-36.
- Ma J, Hu X N, Liu H J, et al. *Phenacoccus solenopsis* Tinsley was found on Chinese hibiscus *Hibiscus rosa-sinensis* in Guangzhou [J]. Plant Quarantine, 2009, 3(2): 35-36. (in Chinese)
- [10] 林进添, 罗 梅, 马 骏, 等. 扶桑绵粉蚧的监测技术与方法 [M]// 万方浩. 生物入侵: 检测与监测篇. 北京: 科学出版社, 2011: 545-552.
- Lin J T, Luo M, Ma J, et al. Surveillance and monitoring of *Phenacoccus solenopsis* [M]// Wan F H. Biological invasions: Detection, surveillance and monitoring. Beijing: Science Press, 2011: 545-552. (in Chinese)
- [11] Fuchs T W, Stewart J W, Minzenmayer R, et al. First report of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley in cultivated cotton in the United States [J]. Southwestern Entomologist, 1991, 16(3): 215-221.
- [12] 王艳平, 武三安, 张润志. 入侵害虫扶桑绵粉蚧在中国的风险分析 [J]. 昆虫知识, 2009, 46(1): 101-106.
- Wang Y P, Wu S A, Zhang R Z. Pest risk analysis of a new invasive pest, *Phenacoccus solenopsis*, to China [J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2009, 46(1): 101-106. (in Chinese)
- [13] Yuasa H J, Suzuki T, Yazawa M. Structural organization of lower marine invertebrate calmodulin gene [J]. Gene, 2001, 279: 205.
- [14] Fok A K, Aihara M Y S, Ishida M, et al. Calmodulin localization and its effects on endocytic and phagocytic membrane trafficking in *Paramecium multimicronucleatum* [J]. J Eukaryot Microbiol, 2008, 55(6): 481-491.
- [15] Soderling T R, Chang B, Brickey D. Cellular signaling through multi-functional Ca^{2+} /calmodulin2 dependent protein kinase II [J]. BiolChem, 2001, 276(5): 3719-3722.
- [16] 朱艺勇, 黄 芳, 吕要斌. 扶桑绵粉蚧生物学特性研究 [J]. 昆虫学报, 2011, 54(2): 246-252.
- Zhu Y Y, Huang F, Lü Y B. Bionomics of mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae) on cotton [J]. Acta Entomologica Sinica, 2011, 54(2): 246-252. (in Chinese)
- [17] 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.
- 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. (in Chinese)
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [19] Gifford J L, Walsh M P, Vogel H J. Structures and metalion-binding properties of the Ca^{2+} -binding helix-loop-helix EF-hand motifs [J]. Biochem, 2007, 405(2): 199.
- [20] Agell N, Aliagué V, Vicenç Alemany R, Castro A, et al. New nuclear functions for calmodulin [J]. Cell Calcium, 1998, 23(2/3): 115-121.
- [21] Chin D, Means A R. Calmodulin: A prototypical calcium sensor [J]. Trends Cell Biol, 2000, 10(8): 322-328.