

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20241004001

<http://www.yykxjz.cn/>

杨文红, 南祎晗, 李萌, 刘春胜, 杨毅, 於锋, 顾志峰. 番红砗磲生物钟基因 *Cryptochrome* 和 *Period* 克隆鉴定及光照相关性分析. 渔业科学进展, 2025, 46(4): 153–167

YANG W H, NAN Y H, LI M, LIU C S, YANG Y, YU F, GU Z F. Cloning, identification, and light response analysis of two circadian clock genes *Cryptochrome* and *Period* in boring giant clam *Tridacna crocea*. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(4): 153–167

番红砗磲生物钟基因 *Cryptochrome* 和 *Period* 克隆鉴定及光照相关性分析*

杨文红¹ 南祎晗^{1,3} 李 萌¹ 刘春胜^{1,2,3①} 杨 毅¹ 於 锋¹ 顾志峰¹

(1. 海南大学海洋生物与水产业学院 海南 海口 570228; 2. 海南大学三亚南繁研究院 海南 三亚 572025; 3. 海南大学海洋生物实验教学示范中心 海南 海口 570228)

摘要 生物钟是生物体适应地球周期性昼夜变化而演化出体内自持的计时机制, *Cryptochrome* 和 *Period* 是生物钟的 2 个核心基因, 其通过形成 PER/CRY 异二聚体调控生物体节律。本研究应用分子生物学和生物信息学技术对番红砗磲(*Tridacna crocea*)生物钟基因 *Cryptochrome* 和 *Period* 的编码区进行了克隆和特征分析, 继而开展了其组织特异性和不同光照周期下的表达节律性研究。结果显示, *Cryptochrome* 编码区碱基序列长 1 641 bp, 编码 546 个氨基酸, 理论等电点为 6.08, 分子量为 62.98 kDa; *Period* 编码区碱基序列长 4 386 bp, 编码 1 461 个氨基酸, 理论等电点为 6.14, 分子量为 164.99 kDa; Hdock 互作模式研究结果显示, 2 个蛋白可形成异二聚体, 结合能为 -279.88 kcal/mol。组织表达分析显示, *Cryptochrome* 和 *Period* 在 7 个组织中均有表达, 其中, 外外套膜、内外套膜、鳃和闭壳肌相对表达量较高(*Cryptochrome* 在心脏中亦有较高表达量)。*Cryptochrome* 和 *Period* 基因在外外套膜、内外套膜、鳃和闭壳肌中均昼夜变化, 并呈现振荡表达的规律。在内、外外套膜中, *Cryptochrome* 和 *Period* 基因分别在光照后 1 h 和光照前 2 h 表达量达到最高, 且均随光照周期的推移(光照时间 07:00~19:00 推迟至 09:00~21:00)而推移; 在鳃组织中, 正常光周期处理的 *Cryptochrome* 和 *Period* 基因均在光照前 1 h 表达量达到最高, 当光照延迟 2 h 后, 2 个基因的最高表达时间推至光照后 1 h; 与之相反, 闭壳肌中 *Cryptochrome* 和 *Period* 基因在 08:00 左右表达量最高, 且未随光照延迟而发生变化。综上, 本研究首次克隆获得番红砗磲 2 个关键生物钟基因 *Cryptochrome* 和 *Period*, 初步验证了这 2 个基因在主要组织表达的昼夜节律性, 结果对揭示番红砗磲行为、生理节律和光照适应机制具有重要意义。

关键词 番红砗磲; *Cryptochrome* 和 *Period*; 昼夜节律; 表达规律

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)04-0153-15

生物体为适应地球周期性昼夜变化而演化出体内自持的计时机制, 即为生物钟(安扬等, 2015; 王晗, 2015)。在模式生物中, 生物钟调控环路是由 4 个基因/蛋白及其类似物(*Clock*、*Bmal1*、*Cryptochrome* 和

* 国家自然科学基金(42266003)和国家重点研发计划(2022YFD2401301; 2022YFD2401305)共同资助。杨文红, Email: ywh14708832761@outlook.com

① 通信作者: 刘春胜, 教授, Email: lcs5113@163.com

收稿日期: 2024-10-04, 收修改稿日期: 2024-11-09

Period)组成,具体表现为 BMAL/CLOCK 与 PER/CRY 异二聚体交替振荡表达,形成生物钟的核心振荡表达信号,并作用于下游效应基因(Kume *et al.*, 1999; Vitaterna *et al.*, 1999; Shearman *et al.*, 2000)。同时,这些基因受外界光照等环境因子的影响,重塑周期节律,最终适应环境的周期性变化(Sancar *et al.*, 2021)。

隐色素(Cryptochromes, Cry1/2)基因又被称为隐花色素,最先在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中被发现,其产物蛋白 CRY 是一种对蓝光极其敏感的黄素蛋白光受体,调节动植物体内昼夜生物钟光导引过程,并且是多细胞动物核心昼夜节律振荡器的组成部分(Kaldenhoff *et al.*, 1993; 谢伟, 2020; 陈利霞, 2020)。周期蛋白基因(Periods, per1/2/3)首次在果蝇(*Drosophila*)中被发现,功能研究表明,PER 蛋白可被酪蛋白激酶 I 蛋白家族(CKIδ/e)磷酸化,促进含有β-转导蛋白重复序列(β-TrCP)介导的降解和核输入(John *et al.*, 2014),并且该蛋白可通过 PAS 功能域与 CRY 蛋白形成异源二聚体复合物参与机体的节律调控(Kucera *et al.*, 2012)。

从 20 世纪 90 年代起,利用昼夜节律周期的精确性这一特点,以生物钟周期长短为指标,通过基因突变和表型筛选结合生物化学方法,从果蝇、小鼠(*Mus musculus*)以及斑马鱼(*Danio rerio*)等模式生物中发现了 Per、Clock、Ckl1e/d 等近 20 种重要的生物钟基因(Tei *et al.*, 1997; Rutila *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2013)。截至目前,关于双壳贝类生物钟基因的研究仍较少,仅在加州贻贝(*Mytilus californianus*)、帽贝(*Cellana rota*)、紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)等生物中发现了 Clk、Cry1、ROR/HR3、Per 和 Reverb 等 5 种生物钟基因,并初步验证了部分生物钟基因存在振荡性节律(Connor *et al.*, 2011; Schnytzer *et al.*, 2018; Chapman *et al.*, 2020)。本课题组前期在番红砗磲(*Tridacna crocea*)的光照相关性研究中发现了生物钟基因 Bmal,并验证了其随光照/黑暗交替呈现振荡性表达节律(Liu *et al.*, 2021)。但尚未有番红砗磲 Cryptochrome 和 Period 节律基因的相关研究报道。

砗磲是珊瑚礁生态系统的重要组成部分,现存 13 种,我国报道有 8 种,主要分布于海南岛以南的珊瑚礁区域(刘春胜, 2021)。番红砗磲是分布最广泛、外套膜颜色最鲜艳的种之一(何园园等, 2020)。砗磲主要特征之一是与虫黄藻(Zooxanthella)共生,而光照在砗磲-虫黄藻共生系统中起到至关重要的作用,因此,开展其生物钟核心基因昼夜节律研究,可为砗磲资源保护与养殖提供数据支撑(Griffiths *et al.*, 1996; Liu

et al., 2021)。本研究聚焦番红砗磲转录组中鉴定的生物钟关键基因 Cryptochrome 和 Period,开展这 2 个基因的生物信息学分析和组织表达特异性分析;继而研究这 2 个基因在不同组织、不同光照周期下的振荡表达规律,可为揭示生物钟基因对番红砗磲的行为和生理节律的调控机制和砗磲资源保护提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验设计与取样

实验所用番红砗磲来源于课题组在三亚珊瑚礁国家级自然保护区人工繁育的子一代群体,挑选壳长为 75~80 mm、健康无损伤个体,随机分为 2 组,每组 30 只,清除表面附着物后于 2 m × 0.8 m × 0.8 m 循环水养殖系统中进行养殖驯化。基于前期番红砗磲不同光照条件下的生长及生理指标变化(刘春胜等, 2018; Liu *et al.*, 2020),本实验设定光照强度为 12 000 lx。实验期间养殖用水盐度为 32.0±0.5,水温为(26.0±1.0)℃,pH 7.5~8.0。正常光照组分别在 07:00 和 19:00 开启和关闭光照装置(12 h 光照:12 h 黑暗),延迟光照组分别在 09:00 和 21:00 开启和关闭光照装置,其他养殖条件与正常光照组相同。从光照后 1 h (正常光照组和延迟光照组起始取样时间分别为 08:00 和 10:00)起,每隔 3 h 进行取样,连续取样 24 h,每组 8 个时间点,每个取样时间点随机取 3 只番红砗磲。取样前,将番红砗磲放置于冰上冷冻麻醉 5 min,而后分别取鳃、外外套膜、内外套膜、闭壳肌、生殖腺、胃和心脏 7 个组织,迅速放入液氮中冷冻暂存,再转入-80℃冰箱保存备用,用于后续总 RNA 的提取。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

使用 E.Z.N.A.TM HP Total RNA 试剂盒提取番红砗磲各个组织中的总 RNA,然后采用琼脂糖凝胶电泳检测是否存在污染和降解,使用 NanoDrop 检测所提 RNA 纯度。使用 Eastep[®] RT Master 反转录试剂盒对上述所提 RNA 模板进行反转录,合成 cDNA,反应体系(10 μL):2 μL Eastep[®] RT Master Mix (5×),3 μL 总 RNA 模板,5 μL RNase-free H₂O;反应程序:37℃ 60 min,98℃ 5 min,4℃ 4 min。反应结束后将 cDNA 保存于-20℃备用。

1.3 Cryptochrome 和 Period 基因的克隆

使用 SeqMan 软件(<https://www.dnastar.com/software/lasergene/seqman-ultra/>)拼接和比对,获取 Cryptochrome 和 Period 基因的预测序列,使用 Primer

Premier 5.0 软件设计引物(表 1), 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测和分离, 用 DNA 凝胶回收试剂盒(赛默飞)回收并纯化目的 PCR 产物, 将目的产物连接到 pEASY-T1 克隆载体(全式金), 然后转化到 Trans1-T1 感受态细胞(全式金)中, 涂布于含氨苄青霉素(索莱宝)抗性的琼脂糖平板上, 37 ℃过夜培养, 挑取阳性克隆送至华大生物科技有限公司测序。20 μL PCR 体系: 10 μL 2 × *Taq* PCR Mix, 3 μL cDNA, 0.5 L 正反向引物, 6 μL ddH₂O。PCR 条件如下: 94 ℃预变性 5 min; 98 ℃变性 10 s, 55 ℃退火 15 s, 72 ℃延伸 1 min, 35 个循环; 72 ℃延伸 5 min。

1.4 生物信息学分析

使用软件 SignalP 5.0 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>)和 SMART (https://smart.embl.de/smart/set_mode.cgi?GENOMIC=1)对 *Cryptochrome* 和 *Period* 功能结构域进行在线分析预测; 通过 ExPASy Server (http://web.expasy.org/compute_pi/)在线分析软件对序列的理化性质进行分析和预测; 运用 DNAMAN 软件(<https://www.lynnon.com/dnaman.html>)进行测序结果的多序列比对; 采用

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库的 BLAST 选项对 *Cryptochrome* 和 *Period* 的序列进行同源性分析; 系统进化树的构建参考陈彦等(2025), 使用 MEGA 7.0 中邻近法(neighbor-joining)对 *Cryptochrome* 和 *Period* 进行系统进化树的构建分析, 其中 bootstrap 为 1 000; 采用 I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>)进行同源建模, 采用 Hdock 研究 *Cryptochrome* 和 *Period* 的相互作用模式; 采用 Pymol 2.3.0 (<https://pymol.org/>)分析对接结果的交互模式。

1.5 实时荧光定量 PCR

使用 Primer Premier 5.0 软件设计荧光定量 PCR (qRT-PCR)特异性引物, 以 Tubulin 为内参基因(刘春胜, 2021; Li *et al.*, 2024) (表 1), 使用 Eastep® qPCR Master Mix 试剂盒进行 qRT-PCR, 每个 cDNA 设计 3 个重复, 反应体系(10 μL 避光): 5 μL SYBR® qPCR Master Mix (2×)、1 μL cDNA 模板、0.2 μL RT-TroCTSB-F/RT-B2M-F (10 μmol/L)、0.2 μL RT-TroCTSB-R/RT-B2M-R (10 μmol/L)、3.6 μL RNase-free H₂O。PCR 条件: 95 ℃ 1 min, 1 个循环; 95 ℃ 15 s, 40 个循环; 60 ℃ 1 min, 40 个循环。

表 1 基因克隆扩增引物
Tab.1 Primer information used in gene cloning amplification.

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 <i>T_m</i> /℃	用途 Purpose
<i>Cryptochrome</i>	F: ATGCCAGCAGGAAGCCTC	58.1	PCR
	R: AAGCTCTGAGGCTTCCTGCT	58.4	PCR
<i>Period</i>	F: ATGCAGTTAAGTAGCAGGAACGT	58.2	PCR
	R: GCACGTTTCCTGCTACTTAACTG	57.4	PCR
<i>Cryptochrome</i>	F: TACCTCCTTGATGCAGATTGGTC	57.77	qRT-PCR
	R: GGGCTTTCCAGGGCTCATACT	59.5	qRT-PCR
<i>Period</i>	F: AGCCAGGAACCAAGTCCAAGAC	65.69	qRT-PCR
	R: GGTAGCCAAGCAGTGAATAGTG	58.32	qRT-PCR
<i>Tubulin</i> (内参)	F: ACCCTCGTATCCACTTCCCTC	60.13	qRT-PCR
	R: AATGGCGGCGTTGACATCTTT	61.17	qRT-PCR

1.6 数据处理

使用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 对 qRT-PCR 的结果进行计算分析, 无论是组织特异性实验或相同组织光照时间实验, 都将实验所得数据中 *C_t* 值最大的实验样本数据表达量设为 1。数据以平均值±标准误(Mean±SE)表示。使用 SPSS 22.0 对数据进行统计学差异分析, 使用单因素方差分析(one-way ANOVA)对结果进行统计, 采用 LSD 法进行多重比较。P<0.05 为差异显著。

2 结果

2.1 *Cryptochrome* 和 *Period* 序列分析

Cryptochrome 序列分析发现, 其编码区碱基序列长 1 641 bp, 编码 546 个氨基酸, 理论等电点为 6.08, 分子量为 62.98 kDa, 亲水性平均系数为-0.417。*Period* 序列进行分析发现, 其编码区碱基序列长 4 386 bp, 编码 1 461 个氨基酸, 理论等电点为 6.14, 分子量为 164.99 kDa, 亲水性平均系数为-0.708。

2.2 *Cryptochrome* 同源性比对与系统进化分析

如图 1a 所示, 在番红砗磲 *Cryptochrome* 中存在 Pfam DNA photolyase (9~173 aa) 和 Pfam FAD binding 7 (293~495 aa) 2 种结构域, 与其他物种类似。序列比对结果显示, 番红砗磲 *Cryptochrome* 与太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 具有最高同源性(62.87%), 其次是南极磷虾(*Euphausia superba*) (44.51%)、人(*Homo sapiens*) (44.38%)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*) (43.82%)、多孔鹿角珊瑚(*Acropora millepora*) (42.21%)、湖泊红球藻(*Haematococcus lacustris*) (20.85%)、青鳉(*Oryzias latipes*) (19.41%)、斑马鱼 (19.01%)、爪蟾(*Xenopus laevis*) (18.18%)、近头状尖胞藻 (*Raphidocelis subcapitata*) (14.20%)、胶球藻 (*Coccomyxa subellipsoidea*) (10.05%) (图 2)。

将上述氨基酸序列构建系统发育树, 发现 *Cryptochrome* 与双壳贝类太平洋牡蛎 *Cryptochrome* 系统发育关系最密切, 与藻类发育关系最远(图 3)。

2.3 *Period* 同源性比对与系统进化分析

如图 1b 所示, 与其他物种的 *Period* 类似, 在番红砗磲中也发现了 1 个 helix loop helic (126~176 aa)、2 个 PAS (211~278 aa, 399~465 aa)、1 个 PAC (473~516 aa) 和 1 个 Pfam Period C (981~1128 aa), 共 4 种结构域。与其他物种 *Period* 氨基酸序列的 GenBank 比对结果显示, 番红砗磲 *Period* 与太平洋牡蛎具有最高同源性(26.22%), 其次是黑脉金斑蝶(*Danaus plexippus*) (17.77%)、褐家鼠(16.19%)、斑马鱼(16.08%)、人(16.01%)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) (15.88%)、爪蟾(15.06%)、小麦(*Triticum aestivum*) (14.16%)、欧洲油菜(*Brassica napus*) (13.84%)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*) (13.63%)、斑点海虱(*Eurydice pulchra*) (13.22%)、近头状尖胞藻 (*Raphidocelis subcapitata*) (9.66%) (图 4)。

将氨基酸序列构建系统发育树, 发现 *Period* 与

双壳贝类太平洋牡蛎 *Period* 系统发育关系最密切, 与藻类关系最远(图 5)。

2.4 *Cryptochrome* 和 *Period* 的相互作用模式

如图 6 所示, 对接结果显示, *Cryptochrome* 和 *Period* 的结合能为-279.88 kcal/mol。*Cryptochrome* 的 ARG-277、ASN-158、ASN-146、HIS-152 分别与 *Period* 的 SER-985、THR-992、ASN-450、ASP-446 形成氢键, 氢键的长度分别为 3.3Å、3.2Å、3.0Å 和 2.2Å。

2.5 *Cryptochrome* 和 *Period* 在番红砗磲中的表达分布

如图 7 所示, 正常光照条件下 *Cryptochrome* 和 *Period* 在 7 个组织中均有表达, 对光照 1 h 的各组织表达进行特异性比较发现, *Cryptochrome* 在生殖腺和内脏团的表达量显著低于外外套膜、内外套膜、闭壳肌、心脏和鳃($P<0.05$); 而 *Period* 在生殖腺、内脏团和心脏的表达量显著低于内外套膜、外外套膜、鳃和闭壳肌($P<0.05$)。

2.6 昼夜节律下番红砗磲 *Cryptochrome* 和 *Period* 在不同组织中的表达分布

正常光照条件下, *Cryptochrome* 在外外套膜、内外套膜和闭壳肌中的表达量均在光照处理 1 h 时最高 ($P<0.05$), 在鳃中则是黑暗处理 5 h 时表达量最高 ($P<0.05$), 随后各组织表达量均随光照时间的增加呈下降趋势, 外外套膜、鳃和闭壳肌中的表达量在光照处理 10 h 时最低, 内外套膜则在黑暗处理 1 h 时表达量最低; 当光照延迟 2 h 后, *Cryptochrome* 在外外套膜、内外套膜和鳃的表达量均在光照 1 h 时最高 ($P<0.05$), 在闭壳肌中黑暗处理 7 h 时最高 ($P<0.05$), 随后均随光照时间的增加呈下降趋势, 外外套膜、鳃和闭壳肌在黑暗处理 1 h 时表达量最低, 内外套膜则在光照处理 10 h 时表达量最低(图 8)。

正常光照条件下, *Period* 在外外套膜、内外套膜

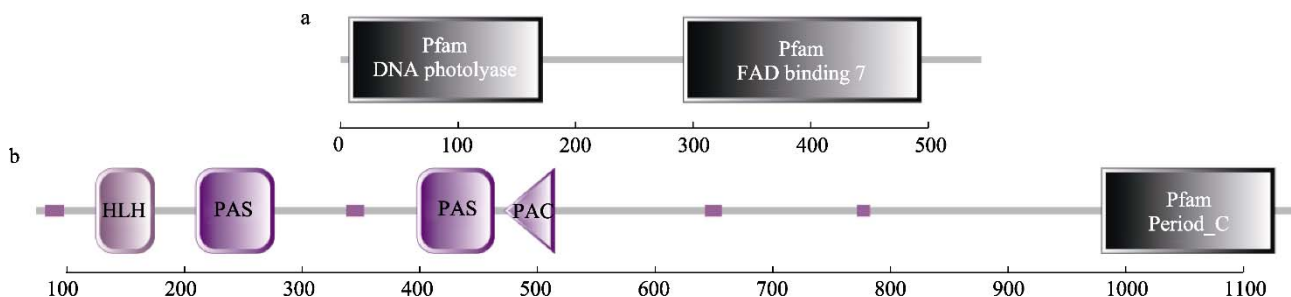
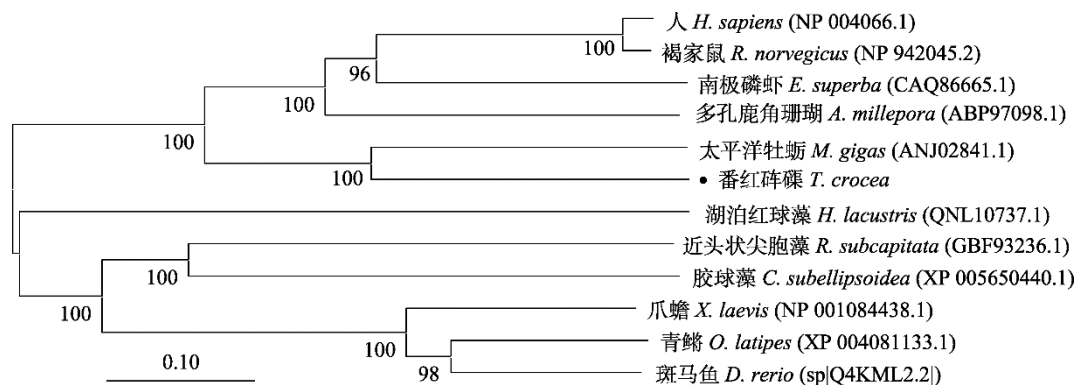


图 1 *Cryptochrome* (a) 和 *Period* (b) 蛋白结构域预测

Fig.1 Structure prediction of *Cryptochrome* (a) and *Period* (b) domains

黑色底表示比对完全相同的氨基酸，蓝色底表示相似度 $\geq 75\%$ 的氨基酸。2个结构域用红色框表示。
The black base indicates identical amino acids, and the blue base indicates amino acids that are more than 75% similar.
The two domains are represented by a red box.

图 3 番红砵藻 *Cryptochrome* 系统发育树Fig.3 Phylogentic tree for the *Cryptochrome* of *T. crocea*

和鳃中的表达量均在黑暗处理 5 h 时最高($P<0.05$), 在闭壳肌中的表达量是在光照处理 1 h 时最高($P<0.05$), 均随着光照时间的增加呈先下降后升高的趋势, 外外套膜、内外套膜和闭壳肌在光照处理 7 h 时最低, 鳃则在黑暗处理 1 h 时最低; 当光照延迟 2 h 后, *Period* 在外外套膜和闭壳肌的表达量均在黑暗处理 7 h 时最高($P<0.05$), 在内外套膜和鳃中则是在光照处理 1 h 时表达量最高($P<0.05$), 均随着光照时间的增加呈下降趋势, 内外套膜、鳃和闭壳肌在光照处理 10 h 时表达量最低, 外外套膜则在光照处理 7 h 时表达量最低(图 8)。

3 讨论

生物体内普遍存在着一套由核心生物钟基因主导的调控系统, 这些基因的功能高度保守, 共同维系着昼夜节律的稳定性(King *et al*, 2000; Mizuno *et al*, 2022; 王慧等, 2024)。本研究以番红砵藻为研究对象, 成功克隆了 *Cryptochrome* 和 *Period* 两个生物钟基因, 预测了 *Cryptochrome* 编码蛋白的分子质量为 62.98 kDa, 与已报道的克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) *PcCry1* 编码的分子量(63.167 kDa)相近(谢伟, 2020); *Period* 编码的蛋白分子量为 164.99 kDa, 与已报道与半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *Per2* 编码的蛋白分子量(154.0 kDa)相近(晏科文等, 2024)。值得注意的是, 与其他物种 *Cryptochrome* 氨基酸序列比对结果表明, 番红砵藻 *Cryptochrome* 与太平洋牡蛎具有较高的同源性(62.97%), 这也表明预测的 *Cryptochrome* 在物种进化过程中具有较高的保守性; 而与其他动植物 *Period* 氨基酸序列的 GenBank 比对结果表明, *Period* 与其他生物的同源性都不高, 表明预测的 *Period* 在物种进化过程中保守性不高。

Cryptochrome 氨基酸序列中的 FAD7 结构域可以在 CRY/PER 异二聚体与 CLOCK/BMAL 异二聚体结

合后, 通过切除 CLOCK/BMAL 异二聚体氨基酸序列中的胸腺嘧啶二聚体使其序列发生改变, 从而抑制 CLOCK/BMAL 异二聚体与 E-box 结合, 实现负反馈调节(Saha *et al*, 2019)。结构域 PAS 可与结构域 bHLH 形成的功能性 DNA 结合复合物 bHLH:PAS, 与顺式元件 E-box 结合激活靶基因的转录, 形成 CLOCK/BMAL 异二聚体的转录因子(Hefti *et al*, 2004; Bian *et al*, 2017)。在半滑舌鳎、欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*) 的 *Cry1a* (或 *Cry1*)和 *Cry2* 序列中发现了功能性结构域 FAD7 (Del *et al*, 2012; 晏科文等, 2024), 在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的 *Cry1* 序列中发现了功能性结构域 FAD (Zhang *et al*, 2022)。在本研究中, 番红砵藻 *Cryptochrome* 氨基酸序列中发现了 Pfam DNA photolyase 和 Pfam FAD binding 7 两种结构域, 在 *Period* 氨基酸序列中发现了 helix loop helix、PAS、PAC 和 Pfam Period C 四种结构域。

生物钟基因间的相互作用及协同调控机制共同维持昼夜节律的恒定, 使得生物体能够通过调节自身活动适应外界变化的环境(何玉慧, 2017), PER 和 CRY 蛋白能形成异二聚体进入细胞核内通过蛋白质-蛋白质间的相互作用抑制 CLOCK (NPAS2)/BMAL 介导的转录激活效应。蛋白质-蛋白质相互作用界面周围的残基可以形成氢键, 这些非共价键可以帮助稳定蛋白质-蛋白质复合物(Bartlett *et al*, 2013)。Mandal 等(2017)研究发现, 蛋白在折叠过程中非极性侧链由于疏水作用而被掩埋, 主链形成 $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}$ 氢键, 而氢键能的静电能项在折叠过程中占主导地位, 以稳定蛋白结构。球状蛋白中的主要氢键发生在主链 $\text{NH}\cdots\text{C}=\text{O}$ 基团之间, 它们是 α -螺旋和 β -折叠结构的关键组成部分。Nangle 等(2014)在对小鼠的研究中发现, 生物钟振荡节律取决于 PER 和 CRY 形成的复合物和周期性周转, PER 和 CRY 形成的复合物抑制转录激活因子复合物 CLOCK/BMAL, 而这种异二聚体蛋白

[illegible]



图 4 *Period* 氨基酸序列同源性比对
Fig.4 Amino acid sequence alignment of *Period*

黑色底表示比对完全相同的氨基酸，蓝色底表示相似度 $\geq 75\%$ 的氨基酸。5 个结构域用红色框表示。
The black base indicates identical amino acids, and the blue base indicates amino acids that are more than 75% similar.
The five domains are shown in red boxes.

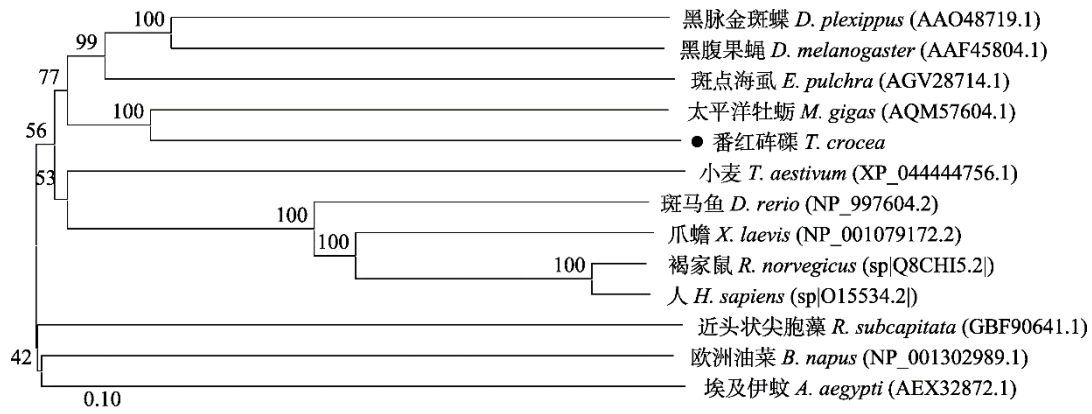
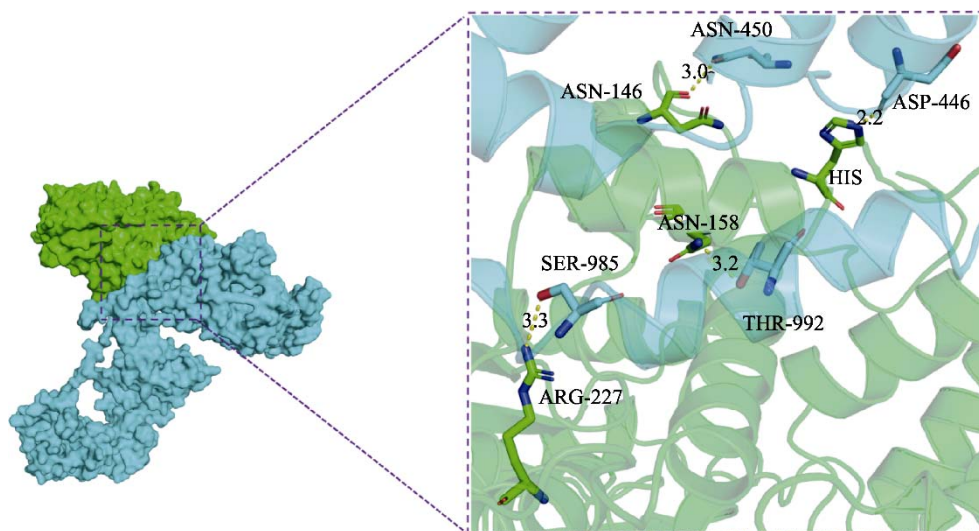


图 5 番红砗磲 *Period* 系统发育树
Fig.5 Phylogenetic tree for the *Period* of *T. crocea*

相互作用是由磷酸盐结合环、界面环和丝氨酸环直接介导的。此外，Nangle 等(2014)和 Schmalen 等(2014)的研究也表明 PER2-CBD-CRY2 复合物的晶体结构揭示了一个结构上重要的分子间锌指(zinc finger)，它起到稳定“分子扣”的作用，并且 PER2-CBD 在 CRY1 和 CRY2 之间具有高度的序列保守性，采用类似于 CRY1 的结合模式，通过分子间的 CCCH 锌结合基序与锌离子进行四面体配位。本研究中，预测出番红砗磲 PER 与 CRY 有 4 个结合位点，2 个蛋白的结合能是 -279.88 kcal/mol，具有一定的结合能力，为番红砗磲 PER 与 CRY 相互作用的深入研究提供了一定的理论基础。

由于内源性生物钟的存在，生物体在生理、行为

和基因表达等方面表现出昼夜节律性，而生物钟核心是普遍存在于不同物种中的由一系列高度保守生物钟基因形成的转录翻译回路(Panda *et al.*, 2002; 符徐泽等, 2022)。Li 等(2024)研究表明，随光照/黑暗交替番红砗磲的行为和生理均表现出一定的节律性。本研究对番红砗磲 *Cryptochrome* 和 *Period* 两个生物钟基因研究发现，正常光照条件下，2 个生物钟基因均具有昼夜节律性，这些节律在恒定条件下持续存在表明番红砗磲具有与其他鱼类相似的内源性生物钟。本研究发现，在正常光照条件下 *Cryptochrome* 和 *Period* 在 7 个组织中均有表达，表明这 2 个基因可广泛参与机体各种生理活动。但 *Cryptochrome* 和 *Period* 在不同组织的表达存在显著的差异性，对光照 1 h 的各组织

图 6 *Cryptochrome* 和 *Period* 交互模式Fig.6 Interaction model of *Cryptochrome* and *Period*

图中绿色为 *Cryptochrome*, 蓝色为 *Period*。

In the figure, green is *Cryptochrome*, and blue is *Period*.

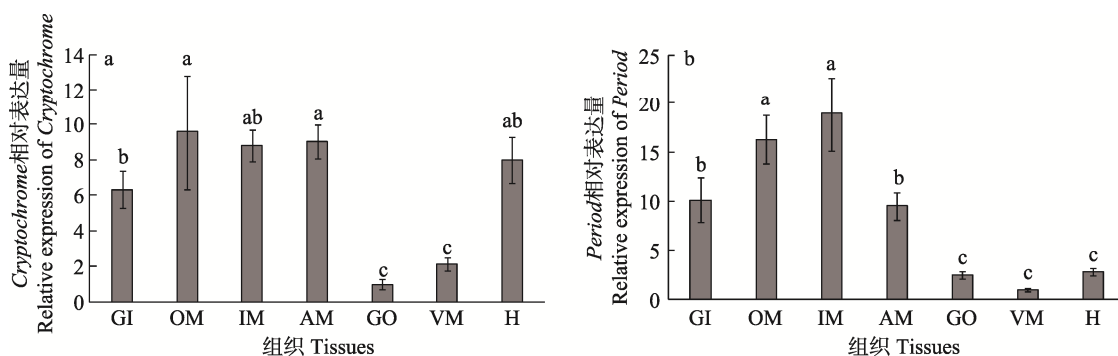


图 7 生物钟基因在番红砗磲中的表达分布

Fig.7 Expression and distribution of clock genes in *T. crocea*

GI: 鳃; OM: 外外套膜; IM: 内外套膜; AM: 闭壳肌; GO: 生殖腺; VM: 内脏团; H: 心脏。

不同字母的数据之间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

GI: Gill; OM: Outer mantle; IM: Inner mantle; AM: Adductor muscle; GO: Gonad; VM: Visceral mass; H: Heart.

Data with different letters were significantly different ($P < 0.05$). The same below.

表达进行特异性比较, 在 *Cryptochrome* 的表达中, 生殖腺中表达水平最低, 外外套膜表达水平最高; 在 *Period* 的表达中, 内脏团中表达水平最低, 内外套膜表达水平最高。外套膜是直接和光接触的, 感光能力较强, 同时砗磲共生虫黄藻生活在砗磲外套膜间隙, 并且共生虫黄藻及其光合作用产物是其能量来源的重要组成部分, 为砗磲提供最高可以达到 90% 以上的能量, 因此, 光照在砗磲-虫黄藻共生系统中起到至关重要的作用 (Hirose *et al*, 2006; Lucas *et al*, 2014), 同样受光照影响的生物钟基因 *Cryptochrome* 和 *Period* 在外套膜表达水平最高。

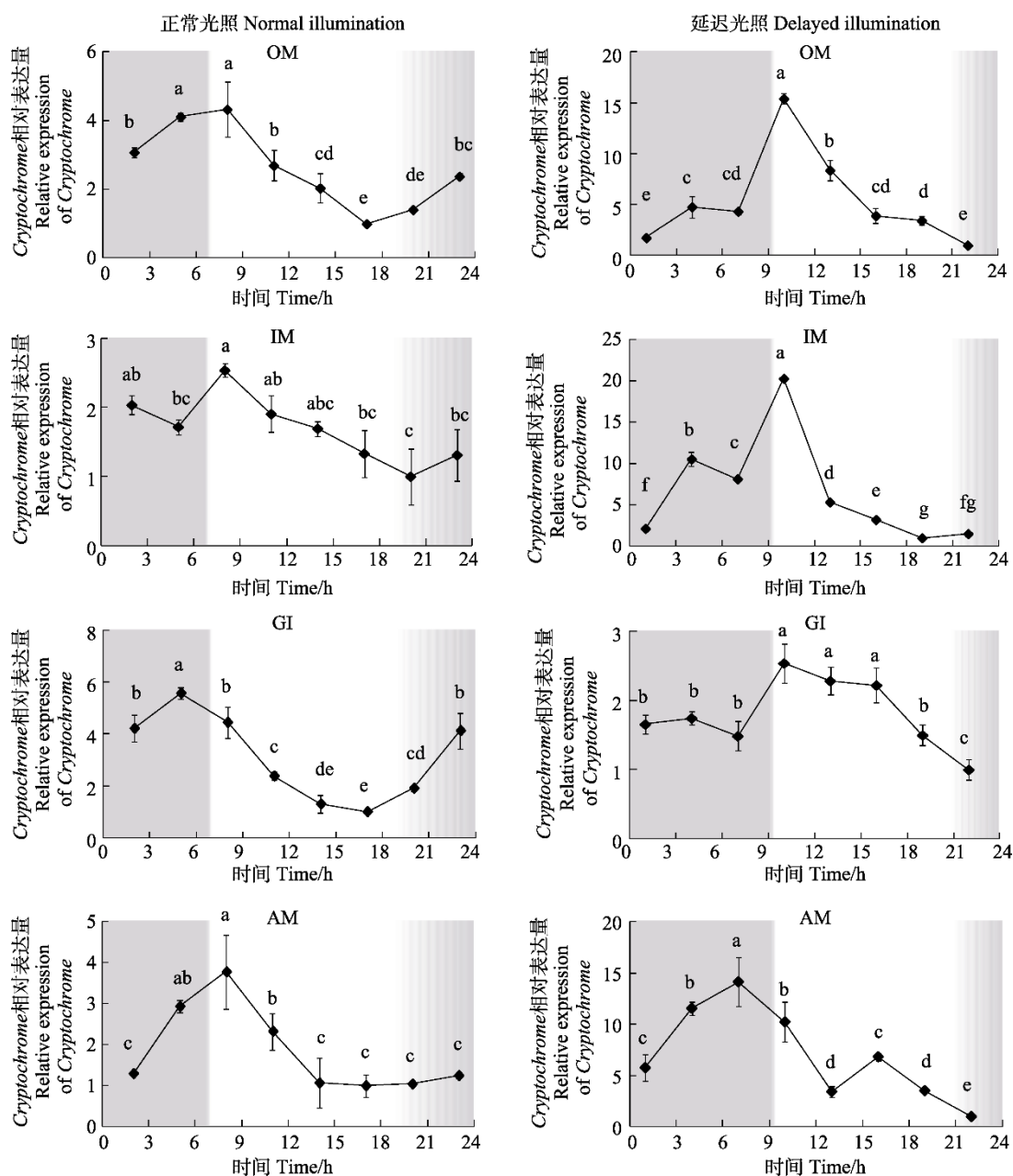
生物钟基因的表达主要是以 24 h 为一个循环单位的时间段受负反馈系统调节而完成的。在欧洲鲈鱼中, *Per* 和 *Cry* 在白天表达量高, 随着光照时间延长表达逐渐降低 (Herrero *et al*, 2014)。本研究中, 正常光照条件下, *Cryptochrome* 在外外套膜、内外套膜和闭壳肌中的表达量均在光照处理 1 h 时最高, 在鳃中是在黑暗处理 5 h 时表达量最高, 而 *Period* 在外外套膜、内外套膜和鳃中的表达量均在黑暗处理 5 h 时最高; 当光照延迟 2 h 后, *Cryptochrome* 在外外套膜、内外套膜和鳃的表达量均在光照 1 h 时最高, 在闭壳肌中表达量是黑暗处理 7 h 时最高, *Period* 在外外套

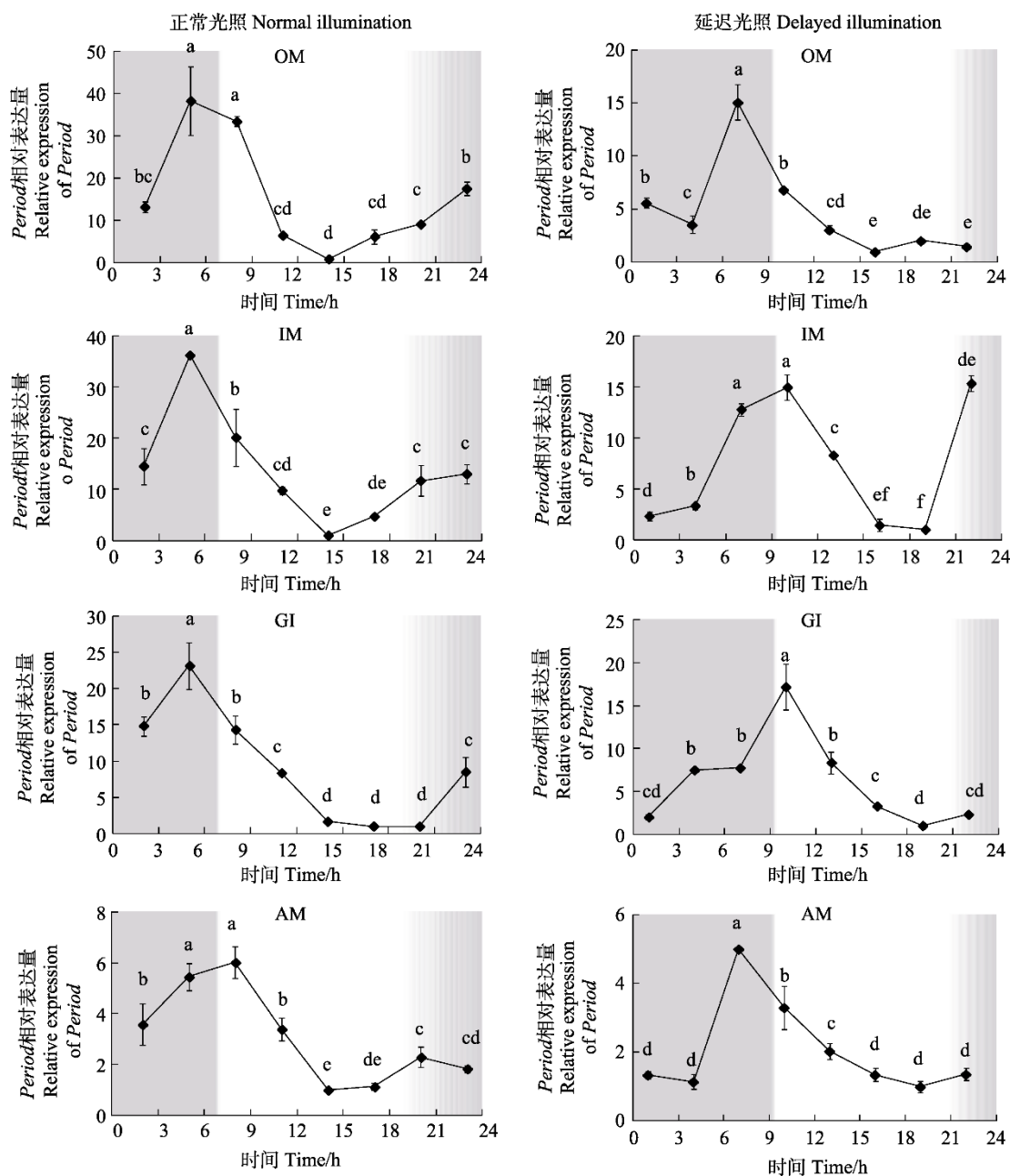
膜和闭壳肌的表达量均在黑暗处理 7 h 时最高, 在内外套膜和鳃中的表达量是在光照处理 1 h 时最高。这是由于 *Cryptochrome* 蛋白是感光受体, 主要在外外套膜、内外套膜和闭壳肌参与光机制的调控, 而 *Period* 可能主要在内外套膜和鳃中参与光的调节机制, 而在受光照刺激后, 负向因子 *Cryptochrome* 和 *Period* 在被翻译成蛋白进入细胞核与正向因子 *Clock* 和 *Bmal* 结合, 从而结束负向因子自身的转录, 从而构成一个负反馈环路调控生物钟系统中负向因子的基因表达(Ip *et al.* 2021), 从而表现出随着光照时间的增加, *Cryptochrome* 和 *Period* 的表达呈下降趋势。该

结果与大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)外周组织中 *Per* 和 *Cry* 光照处理条件下表达量达最高的表达模式相似(袁满等, 2020), 推测番红砵礁的 *Cryptochrome* 和 *Period* 基因也是其生物钟系统的核心基因之一。

4 结论

本研究首次克隆获得番红砵礁 2 个关键生物钟基因 *Cryptochrome* 和 *Period*, 分析了其序列结构及互作模式, 证实了这 2 个基因在内外套膜、内外套膜、鳃和闭壳肌中呈现昼夜振荡表达节律, 且振荡节律随光照周期的延迟而推迟。



图 8 *Cryptochrome* 和 *Period* 在番红砗磲不同组织中的表达Fig.8 Expression of *Cryptochrome* and *Period* in different tissues of *T. crocea*

OM 表示外外套膜, IM 表示内外套膜, GI 表示鳃, AM 表示闭壳肌。

左侧图片表示正常光照组, 右侧图片表示延迟 2 h 光照组。

OM: Outer mantle; IM: Inner mantle; GI: Gill; AM: Adductor muscle.

Pictures on the left show the normal light group, and the right pictures show 2 h delayed illumination group.

参 考 文 献

- AN Y, XU Y. The mechanism of mammalian circadian rhythms. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2015, 27(11): 1372-1379 [安扬, 徐璿. 哺乳动物昼夜节律机制研究进展. 生命科学, 2015, 27(11): 1372-1379]

- BARTLETT G J, NEWBERRY R W, VANVELLER B, *et al.* Interplay of hydrogen bonds and $n \rightarrow \pi^*$ interactions in proteins. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(49): 18682-18688
- BIAN S S, ZHENG X L, SUN H Q, *et al.* Clock1a affects mesoderm development and primitive hematopoiesis by regulating Nodal-Smad3 signaling in the zebrafish embryo.

- Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(34): 14165–14175
- CHANG H C, GUARENTE L. SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging. *Cell*, 2013, 153(7): 1448–1460
- CHAPMAN E C, BONSOR B J, PARSONS D R, *et al.* Influence of light and temperature cycles on the expression of circadian clock genes in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 2020, 159: 104960
- CHEN L X. Investigation of nipped-A and circadian clock genes in *Drosophila* circadian rhythm and sleep regulation. Doctoral Dissertation of Huazhong University of Science and Technology, 2020 [陈利霞. Nipped-A 和近日时钟基因调控果蝇近日节律和睡眠的研究. 华中科技大学博士研究生学位论文, 2020]
- CHEN Y, SHI B, WANG C G, *et al.* LH gene cloning, sequence feature analysis and prokaryotic expression in *Conger myriaster*. *Progress in Fishery Sciences*, 2025, 46(3): 40–52 [陈彦, 史宝, 王成刚, 等. 星康吉鳗(*Conger myriaster*) LH 基因的克隆、序列特征分析及原核表达. 渔业科学进展, 2025, 46(3): 40–52]
- CONNOR K M, GRACEY A Y. Circadian cycles are the dominant transcriptional rhythm in the intertidal mussel *Mytilus californianus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(38): 16110–16115
- DEL POZO A, VERA L M, SÁNCHEZ J A, *et al.* Molecular cloning, tissue distribution and daily expression of cry1 and cry2 clock genes in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2012, 163(3/4): 364–371
- FU X Z, ZOU Z Y, XIAO W, *et al.* Effects of different photoperiods on the expression of circadian clock genes in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2022, 30(3): 539–549 [符徐泽, 邹芝英, 肖炜, 等. 不同光照周期对尼罗罗非鱼生物钟基因表达的影响. 农业生物技术学报, 2022, 30(3): 539–549]
- GRIFFITHS C L, KLUMPP D W. Relationships between size, mantle area and zooxanthellae numbers in five species of giant clam (*Tridacnidae*). *Marine Ecology Progress Series*, 1996, 137: 139–147
- HE Y H. Gene structure and functional analysis of circadian clock genes in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2017 [何玉慧. 草鱼生物钟基因结构及功能初步研究. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2017]
- HE Y Y, LIU E T, GU Z F, *et al.* Colour polymorphism of *Tridacna crocea* mantle and its correlation with growth traits. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 176–182 [何园园, 刘二田, 顾志峰, 等. 番红砗磲外套膜颜色多态性及其与生长性状相关性研究. 渔业科学进展, 2020, 41(2): 176–182]
- HEFTI M H, FRANÇOIS K J, DE VRIES S C, *et al.* The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(6): 1198–1208
- HERRERO M J, LEPESANT J M J. Daily and seasonal expression of clock genes in the pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology*, 2014, 208: 30–38
- HIROSE E, IWAI K, MARUYAMA T. Establishment of the photosymbiosis in the early ontogeny of three giant clams. *Marine Biology*, 2006, 148(3): 551–558
- IP Y K, CHEW S F. Light-dependent phenomena and related molecular mechanisms in giant clam-dinoflagellate associations: A review. *Frontiers in Marine Science*, 2021, 8: 627722
- KALDENHOFF R, KÖLLING A, RICHTER G. A novel blue light- and abscisic acid-inducible gene of *Arabidopsis thaliana* encoding an intrinsic membrane protein. *Plant Molecular Biology*, 1993, 23(6): 1187–1198
- KING D P, TAKAHASHI J S. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annual Review of Neuroscience*, 2000, 23: 713–742
- KUCERA N, SCHMALEN I, HENNIG S, *et al.* Unwinding the differences of the mammalian PERIOD clock proteins from crystal structure to cellular function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(9): 3311–3316
- KUME K, ZYLKA M J, SRIRAM S, *et al.* mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, 1999, 98(2): 193–205
- LI M, YANG W H, HONG X, *et al.* Effects of the daily light-dark cycle on rhythms of behavior and physiology in boring giant clam *Tridacna crocea*. *Marine Biology*, 2024, 171(8): 149
- LIU C S, LI X B, WU C L, *et al.* Effects of three light intensities on the survival, growth performance and biochemical composition of two size giant clams *Tridacna crocea* in the Southern China Sea. *Aquaculture*, 2020, 528: 735548
- LIU C S, LIU X X, WANG H, *et al.* Effects of light intensity and spectra on metabolism of ammonia, active phosphates, and oxygen consumption in *Tridacna crocea*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(2): 313–318 [刘春胜, 刘小霞, 汪浩, 等. 光照强度和光色对番红砗磲(*Tridacna crocea*) 氨氮、活性磷酸盐及氧代谢的影响. 海洋与湖沼, 2018, 49(2): 313–318]
- LIU C S, YANG X Y, SUN Y, *et al.* Effects of the daily light/dark cycle on photosynthetic performance, oxidative stress and illumination-related genes in boring giant clam *Tridacna crocea*. *Marine Biology*, 2021, 168(5): 71
- LIU C S. Distribution of giant clam in coastal waters of Sanya and illumination adaptability of *Tridacna crocea*. Doctoral

- Dissertation of Hainan University, 2021 [刘春胜. 三亚近海砵资源分布及番红砵光照适应机制. 海南大学博士研究生学位论文, 2021]
- LUCAS J S. Giant clams. *Current Biology*, 2014, 24(5): R183–R184
- MANDAL S K, GUILLOT B, MUNSHI P. Topological analysis of hydrogen bonds and interaction energies in proteins. *Acta Crystallographica Section A Foundations and Advances*, 2017, 73(a2): C573
- MIZUNO T, HIGO S, KAMEI N, *et al.* Effects of general anesthesia on behavioral circadian rhythms and clock-gene expression in the suprachiasmatic nucleus in rats. *Histochemistry and Cell Biology*, 2022, 158(2): 149–158
- NANGLE S N, ROSENSWEIG C, KOIKE N, *et al.* Molecular assembly of the period-cryptochrome circadian transcriptional repressor complex. *eLife*, 2014, 3: e03674
- PANDA S, HOGENESCH J B, KAY S A. Circadian rhythms from flies to human. *Nature*, 2002, 417(6886): 329–335
- RUTILA J E, SURI V, LE M, *et al.* CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell*, 1998, 93(5): 805–814
- SAHA S, SINGH K M, GUPTA B B P. Melatonin synthesis and clock gene regulation in the pineal organ of teleost fish compared to mammals: Similarities and differences. *General and Comparative Endocrinology*, 2019, 279: 27–34
- SANCAR A, VAN GELDER R N. Clocks, cancer, and chronochemotherapy. *Science*, 2021, 371(6524): eabb0738
- SCHMALEN I, REISCHL S, WALLACH T, *et al.* Interaction of circadian clock proteins CRY1 and PER2 is modulated by zinc binding and disulfide bond formation. *Cell*, 2014, 157(5): 1203–1215
- SCHNYTZER Y, SIMON-BLECHER N, LI J, *et al.* Tidal and diel orchestration of behaviour and gene expression in an intertidal mollusc. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 4917
- SHEARMAN L P, SRIRAM S, WEAVER D R, *et al.* Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 2000, 288(5468): 1013–1019
- ST JOHN P C, HIROTA T, KAY S A, *et al.* Spatiotemporal separation of PER and CRY posttranslational regulation in the mammalian circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(5): 2040–2045
- TEI H, OKAMURA H, SHIGEYOSHI Y, *et al.* Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature*, 1997, 389(6650): 512–516
- VITATERNA M H, SELBY C P, TODO T, *et al.* Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(21): 12114–12119
- WANG H, XU N N, LI X T, *et al.* The circadian expression rhythms and adaptive evolution of the core circadian clock gene *Per1* in bats. *Acta Theriologica Sinica*, 2024, 44(3): 259–267 [王慧, 许宁宁, 李昕彤, 等. 蝙蝠核心生物钟基因 *Per1* 昼夜表达节律与适应性进化研究. 兽类学报, 2024, 44(3): 259–267]
- WANG H. Circadian biology and its recent progresses. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2015, 27(11): 1313–1319 [王晗. 生物钟生物学及其研究进展. 生命科学, 2015, 27(11): 1313–1319]
- XIE W. Effects of temperature and light on growth and circadian oscillations of clock and cryptochrome in *Procambarus clarkii*. Master's Thesis of Nanjing Normal University, 2020 [谢伟. 温度和光照对克氏原螯虾生长及其生物钟基因 clock 和 cryptochrome 节律振荡表达的影响. 南京师范大学硕士研究生学位论文, 2020]
- YAN K W, MA X D, SHI B, *et al.* Cloning and expression analysis of clock genes during ovarian development and maturation of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Progress in Fishery Sciences*, 2024, 45(3): 101–116 [晏科文, 马晓东, 史宝, 等. 半滑舌鲷生物钟相关基因克隆及在卵巢发育成熟过程中表达特征分析. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 101–116]
- YUAN M, WANG P F, YAN L L, *et al.* Circadian rhythmicity of clock genes in pituitary and hypothalamus of spotted sea perch (*Lateolabrax maculatus*) under three photoperiod conditions. *South China Fisheries Science*, 2020, 16(6): 39–46 [袁满, 王鹏飞, 闫路路, 等. 花鲈垂体和下丘脑中生物钟基因在 3 种光周期下的表达节律分析. 南方水产科学, 2020, 16(6): 39–46]
- ZHANG P, SUN B G. Cryptochrome 1 is involved in anti-bacterial immunity in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 2022, 561: 738675

(编辑 冯小花)

Cloning, Identification, and Light Response Analysis of Two Circadian Clock Genes *Cryptochrome* and *Period* in Boring Giant Clam *Tridacna crocea*

YANG Wenhong¹, NAN Yihan^{1,3}, LI Meng¹, LIU Chunsheng^{1,2,3①}, YANG Yi¹, YU Feng¹, GU Zhifeng¹

(1. School of Marine Biology and Fisheries, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. School of Breeding and Multiplication, Hainan University, Sanya 572025, China;

3. Marine Biology Experimental Teaching Demonstration Center, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract The circadian clock is an intrinsic timing mechanism that has evolved in organisms to adapt to the Earth's periodic diurnal changes. *Cryptochrome* and *Period* genes are pivotal in regulating the circadian system. These form PER/CRY heterodimer complexes, which translocate from the cytoplasm to the nucleus and inhibit the transcription of CLOCK/BMAL1-driven E-box elements, thereby functioning as downstream effector genes. These two genes are also influenced by environmental cues, such as external light, which can remodel the periodic rhythm and ultimately facilitate adaptation to environmental rhythmic changes. The boring giant clam *Tridacna crocea* is a dominant species within the Tridacnidae family, with notable economic and ecological importance. However, this species is currently classified as a rare and protected animal owing to environmental changes, overfishing and other factors. A defining characteristic of this species is its symbiotic relationship with zooxanthellae, in which light plays a fundamental role in the giant clam-zooxanthellae symbiosis. Additionally, light is a crucial regulatory factor influencing the circadian clock. Consequently, exploring the influence of circadian rhythms on the expression of core clock genes in *T. crocea* can provide crucial data to support conservation efforts and breeding programs for this species.

In this study, the SeqMan software was used to assemble sequences obtained through sequencing. The software SignalP 5.0 Server and SMART 4.0 were used to conduct online analysis and prediction of giant clam *Cryptochrome* and *Period* functional domains. The ExPASy Server online analysis software was used to analyze and predict the physicochemical properties of the sequences, DNAMAN software was used to conduct multiple sequence comparison of the sequencing results, and the BLAST option of NCBI database was used to conduct homology analysis of *Cryptochrome* and *Period* sequences. The phylogenetic tree of *Cryptochrome* and *Period* was constructed and analyzed using the neighbor-joining method in MEGA 7.0. For homology modeling, I-TASSER was adopted, and Hdock was utilized to investigate the interaction mode between *Cryptochrome* and *Period*. The interaction mode of the docking results was analyzed with PyMOL 2.3.0. Furthermore, PCR technology was employed to clone and characterize the coding regions of the *Cryptochrome* and *Period* from *T. crocea*. Subsequently, tissue-specific expression analysis of *Cryptochrome* and *Period* was performed, and their expression levels in various tissues were quantified under different photoperiods.

The results showed that the coding region of *Cryptochrome* has a base sequence length of 1 641 bp, encoding 546 amino acids, with a theoretical isoelectric point of 6.08 and a molecular weight of 62.98 kDa; the coding region of *Period* has a base sequence length of 4 386 bp, encoding 1 461 amino acids, with a theoretical isoelectric point of 6.14 and a molecular weight of 164.99 kDa. The Hdock interaction

① Corresponding author: LIU Chunsheng, Email: lcs5113@163.com

model showed that these two proteins could form heterodimers with a binding energy of -279.88 kcal/mol. Tissue expression analysis indicated that *Cryptochrome* and *Period* were expressed in all seven tissues examined, with relatively high expression levels in the outer mantle, inner mantle, gill and adductor muscle (*Cryptochrome* showed a high level of expression in the heart). *Cryptochrome* and *Period* genes exhibited oscillatory expression patterns that varied with the circadian cycle in the outer mantle, inner and outer mantle, gill, and adductor muscle. Under normal lighting conditions, the expression level of *Cryptochrome* in the outer mantle, inner and outer mantle, and the adductor muscle all reached the maximum value at 1 h of light treatment, whereas the expression level in the gill reached the maximum value at 5 h of dark treatment, and then showed a decreasing trend with increased light time. When the illumination was delayed for 2 h, the expression level of *Cryptochrome* in the outer mantle, inner and outer mantle, and gill all reached the maximum value at 1 h illumination. The expression level in the adductor muscle reached the maximum value at 7 h darkness treatment, and then all showed a decreasing trend with increased illumination time. Under normal light conditions, the expression level of *Period* in the outer mantle, inner and outer mantle, and gill reached the maximum value at 5 h of darkness treatment, whereas the expression levels in the adductor muscle reached the maximum value at 1 h of light treatment, and all showed a trend of first decreasing and then increasing with increased light time. When the illumination was delayed for 2 h, the expression level of *Period* in outer mantle and adductor muscle reached the maximum value at 7 h of darkness treatment, In contrast, the expression levels in inner and outer mantle and gill reached the maximum value at 1 h of light treatment, and both showed a decreasing trend with an increased illumination time. In conclusion, this study represents the initial successful cloning of two essential circadian clock genes, *Cryptochrome* and *Period*, from the species *T. crocea*. Our preliminary validation of the diurnal rhythmic expression patterns of these genes in key tissues provided valuable insights into the behavioral and physiological rhythms of *T. crocea*, as well as its mechanisms underlying light adaptation.

Key words *Tridacna crocea*; *Cryptochrome* and *Period*; Circadian rhythm; Expressive rule