

文章编号: 1004 - 7271(2008)04 - 0390 - 06

银鲳皮肤和肌肉组织的基因表达谱分析

杨琳琳¹, 蒋燕¹, 杨桂梅^{1,2}, 许柳雄³, 陈新军³, 徐善良⁴, 鲍宝龙¹

(1. 上海海洋大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090;

2. 复旦大学国家重点实验室, 上海 200090;

3. 上海海洋大学海洋科学学院, 上海 200090;

4. 宁波大学生命学院海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要:采用目前国际上最为通用的 cDNA 文库构建方法, 构建了银鲳皮肤和肌肉组织的 cDNA 文库, 通过一定规模的序列测定, 并借助生物信息学技术, 分析了 164 个序列, 得到了 105 个不同的基因(或表达序列标签), 在 105 个不同的基因中, 68.6% 基因没有冗余, 1 倍、2 倍、3 倍和 4 倍冗余的分别占 23.8%、3.8%、2.8% 和 1%。皮肤和肌肉组织表达基因的组成中, 除了 21 个没有同源序列的未知基因外, 可初步归为代谢相关的酶(38 个)、DNA 有关的酶(7 个)、结构蛋白(4 个)、膜蛋白(13 个)、线粒体蛋白(1 个)、转录因子(9 个)、信号传导相关的蛋白(10 个)和未知蛋白(2 个)等 8 大类, 其中, 转录因子、膜蛋白, 和 DNA 有关的酶的基因冗余程度相对较高。这些研究结果, 为积累银鲳遗传方面的基础信息, 了解银鲳皮肤和肌肉组织的基因表达提供了较好的研究基础。

关键词:银鲳; 基因表达谱; 皮肤; 肌肉; 表达序列标签

中图分类号:S 917 **文献标识码:**A

Gene expression profile in skin and muscle of *Pampus argenteus*

YANG Lin-lin¹, JIANG Yan¹, YANG Gui-mei^{1,2}, XU Liu-xiong³,

CHEN Xin-jun³, XU Shan-liang⁴, BAO Bao-long¹

(1. Agriculture Ministry Key Laboratory for Aquatic Genetic Resources and Aquaculture Ecology, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China;

2. State Key Laboratory of Genetic Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China;

3. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China;

4. Key Laboratory of Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Only a very little molecular genetic information of *Pampus argenteus* was reported before. It is far from enough in this aspect as *Pampus argenteus* is a very important valued fish in China. Recent advancement of molecular techniques made large genes identified and high throughput analysis of transcription possible. In this research, we have analyzed 164 expressed sequence tags (ESTs) derived from a skin and muscle library. Of the 164 ESTs analyzed, 68.6% genes were singletons while 23.8%, 3.8%, 2.8%, and 1% genes represented by two or more ESTs. 84 unique genes had homologies with other organisms while other 21 unique

收稿日期: 2007-09-18

基金项目: 上海海洋生物资源与环境创新平台项目(6870305); 上海市教委重点学科项目(Y1101); 上海市教委重点项目(06ZZ65)

作者简介: 杨琳琳(1983-), 女, 辽宁辽阳人, 硕士研究生, 专业方向为分子生物学和鱼类分子免疫学。E-mail: llyang@stmail.shou.edu.cn

通讯作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

genes had no significant homologies and were designated as unknown. Functional categorization of 84 genes identified here could be classified into eight groups: metabolism related enzyme or protein(38), DNA related enzyme(7), structure protein(4), membrane protein(13), mitochondrial protein(1), transcription factor(9), signal transduction protein(10), and unknown protein(2). The gene expression redundancy of transcription factor, membrane protein, and DNA related enzyme groups were relatively higher than those of other groups in skin and muscle of *Pampus argenteus*. These results provided here may help us to understand those genes expression better in skin and muscle and be valuable for future gene functional studies.

Key words: *Pampus argenteus*; gene expression profile; skin; muscle; expressed sequence tag

银鲳 *Pampus argenteus*(Euphrasen)广泛分布在中国南海、东海、黄海及渤海等水域,是中国近岸重要的渔业对象。由于其肉味鲜美,在中国市场历来深受欢迎。近年来,银鲳的资源在逐渐萎缩,不仅可捕的资源量逐渐减少,而且,捕获的银鲳规格越来越小。银鲳的生物学和资源状况已有不少报道^[1-7],东海银鲳的人工繁殖已经获得初步的成功^[3]。但目前关于银鲳遗传方面的信息非常有限,GenBank 数据库中只有 27 种核苷酸序列,而且均为线粒体基因、核糖体基因和微卫星序列,缺少功能基因方面的序列信息。本研究主要关注银鲳的皮肤和肌肉组织的基因表达谱分析,对今后更好地了解开发和利用银鲳功能基因及有关银鲳基因资源的保护和开发,提供更多信息。

1 材料与方法

1.1 样品来源和总 RNA 抽提

银鲳采自舟山群岛六横岛附近海域,取 5 尾银鲳的皮肤和肌肉组织,先用液氮冷冻,然后研磨成粉状并均匀混和,按照 Trizol(Invitrogen 公司)的使用说明,取一定重量的粉状组织样品进行总 RNA 的提取。总 RNA 质量和浓度经凝胶电泳检测。

1.2 cDNA 文库构建

mRNA 纯化采用 mRNA 纯化试剂盒(Pharmacia 公司)进行,具体步骤详见以前的文献报道^[8-9],采用 SuperScript^(tm) Plasmid System 试剂盒(Invitrogen 公司)构建 cDNA 文库,以 mRNA 为模板合成 cDNA 第一条链,再以 cDNA 第一条链为模板合成第二条链,将此双链 cDNA 的混合物通过分子筛柱进行片段筛选,选择较长(>500 bp)的双链 DNA 分子进行 Adaptor 的连接,由于此 Adaptor 具有 *Nco* I 和 *Pst* I 的酶切位点,酶切后可连接到 pSPORT1 质粒克隆载体,采用电转化方法,将载体导入 ElectroMax DH12STM 电感受态细胞,蓝白斑筛选阳性克隆,随机挑选阳性克隆,质粒抽提后以插入片段 5 方向上的载体测序引物进行测序反应,所用测序仪为 ABI3730XL(ABI 公司)。

1.3 生物信息学分析

序列经过软件包 Vector *NTI Advance*TM 8(Invitrogen 公司)去掉载体和接头序列后,采用软件包 Vector *NTI Advance*TM 8 中的 Contig Express 进行聚类(缺省值 100 bp),把各重叠群的代表序列和没有聚合的序列,送网络软件 Blast2GO 进行 Blast x 比对。

2 结果

2.1 银鲳皮肤和肌肉组织表达基因的总体分析

共随机测序 224 个克隆,去除插入片断 <100 bp 和空载体以外,共得到 164 个序列。在 105 个不同的基因中,没有冗余的基因数目为 72,占总数的 68.6%,最多 4 倍冗余的基因数为 1,约占总数的 1%,此外,1 倍、2 倍和 3 倍冗余的分别占 23.8%,3.8% 和 2.8%(见图 1)。

2.2 银鲳皮肤和肌肉组织基因表达谱分析

银鲳皮肤和肌肉组织中表达基因的组成,除了 21 个没有同源序列的未知基因外,其余约可分为代谢相关的酶、DNA 有关的酶、结构蛋白、膜蛋白、线粒体蛋白、转录因子、信号传导相关的蛋白和未知蛋白等 8 大类,其中编码与代谢相关酶的基因数最多(38 个),膜蛋白(13 个)、信号传导相关的蛋白(10 个)、转录因子(9 个)等也有一定的基因数量,转录因子、膜蛋白,和 DNA 有关的酶的基因冗余数较高(1.0~1.8)(见表 1)。利用 BLASTX 鉴定所推断的各种银鲳基因的名称见表 2,最大相似性(Max e-Value)小于 E-10,均被给定所推断的基因名称。

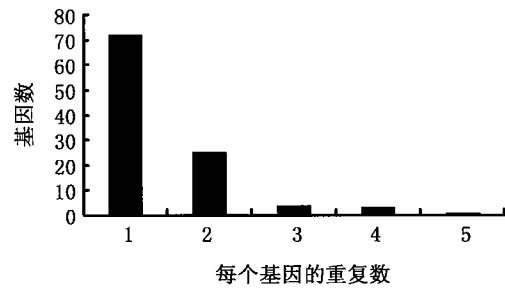


图 1 银鲳皮肤和肌肉组织基因表达谱序列冗余程度分析

Fig. 1 Expression profiles and sequencing redundancy in the analysis of ESTs from the *Pampus argenteus* skin and muscle tissue

表 1 银鲳皮肤和肌肉组织基因的表达谱

Tab. 1 Expression profiles of *Pampus argenteus* ESTs in the skin and muscle tissues

类别	基因数目	克隆数	平均冗余数
代谢相关的酶	38	49	1.3
DNA 有关的酶	7	12	1.7
结构蛋白	4	4	1.0
膜蛋白	13	23	1.8
线粒体蛋白	1	1	1.0
转录因子	9	16	1.8
信号传导相关的蛋白	10	14	1.4
未知蛋白	2	2	1.0
没有同源序列	21	30	1.4

表 2 利用 BLASTX 鉴定的银鲳基因的名称和相似性

Tab. 2 New *Pampus argenteus* genes identified by BLASTX similarity comparison and their expressions

克隆名	GenBank 接受号	预测的基因名	最大相似性	出现频率
cs8-f12	EX152699	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	1.00E-43	2
cs2-f12	EX152700	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylidihydropteridine pyrophosphokinase	1.00E-82	1
cs1-f03	EX152701	2-keto-3-deoxy-galactonokinase	1.00E-83	1
cs10-e04	EX152702	acyl-dehydrogenase	1.00E-47	1
cs6-e06	EX152703	acyl-dehydrogenase family protein	1.00E-78	1
cs13-c08	EX152704	aldehyde dehydrogenase	1.00E-86	1
cs8-h02	EX152705	aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase	1.00E-42	1
cs10-c12	EX152706	aldo keto reductase	1.00E-35	2
cs13-f12	EX152707	amidohydrolase family protein	1.00E-41	1
cs13-b11	EX152708	arginine biosynthesis bifunctional protein	1.00E-47	3
cs9-b07	EX152709	arylsulfatase regulator	1.00E-72	2
cs8-a09	EX152710	beta(1-6) glucans synthase	1.00E-73	1
cs2-a02	EX152711	carboxyphosphoenolpyruvate phosphonmutase	1.00E-62	1
cs8-b08	EX152712	cog0477: permeases of the major facilitator superfamily	1.00E-05	1
cs11-b07	EX152713	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	1.00E-29	1
cs11-e08	EX152714	cytochrome c-type biogenesis protein	1.00E-47	1
cs13-a03	EX152715	Formate alpha dehydrogenase subunit	1.00E-72	2
cs13-e02	EX152716	glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase	1.00E-95	2
cs13-g12	EX152717	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.00E-21	1
cs11-h11	EX152718	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	1.00E-50	1
cs13-d10	EX152719	glycoside family 3 domain protein	1.00E-64	1

· 续表 2 ·

克隆名	GenBank 接受号	预测的基因名	最大相似性	出现频率
cs8-d12	EX152720	gnat family	1.00E-15	1
cs13-a05	EX152721	hydroxypyruvate isomerase	1.00E-101	1
cs2-c01	EX152722	mannitol dehydrogenase	1.00E-88	1
cs13-b06	EX152723	monooxygenase	1.00E-58	1
cs11-f10	EX152724	n-acetylglutamate synthase	1.00E-63	2
cs9-a06	EX152725	peptidase u32	1.00E-73	2
cs9-c06	EX152726	phenazine biosynthesis family protein	1.00E-44	1
cs10-f12	EX152727	phenylacetaldehyde dehydrogenase	1.00E-49	1
cs9-e10	EX152728	uracil-xanthine permease	1.00E-65	2
cs13-c12	EX152729	xanthine uracil vitamin c permease	1.00E-59	1
cs10-b11	EX152730	zinc abc permease protein	1.00E-55	1
cs10-e01	EX152731	zinc-containing alcohol dehydrogenase superfamily	1.00E-52	1
cs11-h10	EX152732	precorrin-6x reductase	1.00E-37	1
cs1-h03	EX152733	short-chain dehydrogenase reductase sdr	1.00E-66	1
cs6-h02	EX152734	short-chain dehydrogenase reductase sdr	1.00E-15	1
cs11-a10	EX152735	succinic semialdehyde dehydrogenase	1.00E-58	2
cs9-f04	EX152736	threonine synthase	1.00E-33	1
cs10-h01	EX152737	crossover junction endodeoxyribonuclease	1.00E-67	1
cs13-e08	EX152738	dna ligase	1.00E-77	1
cs13-g10	EX152739	dna polymerase i	1.00E-55	2
cs10-b06	EX152740	o6-methylguanine-dna methyltransferase	1.00E-54	1
cs11-g09	EX152741	exodeoxyribonuclease iii xth	1.00E-37	2
cs9-b12	EX152742	holliday junction dna helicase	1.00E-28	4
cs7-c06	EX152743	trna nucleotidyltransferase	1.00E-38	1
cs6-a11	EX152744	cellulose subunit b	1.00E-51	1
cs8-b04	EX152745	glycosyl group 1	1.00E-22	1
cs8-a02	EX152746	flagellar hook-associated protein	1.00E-23	1
cs9-h05	EX152747	myosin heavy chain	1.00E-43	1
cs13-f07	EX152748	cation efflux protein	1.00E-38	1
cs9-h02	EX152749	class II aldolase/adducin family protein	1.00E-58	1
cs8-g12	EX152750	mechanosensitive ion channel	1.00E-23	1
cs11-f05	EX152751	membrane protein	1.00E-19	5
cs8-f11	EX152752	membrane protein	1.00E-49	1
cs9-f08	EX152753	membrane protein	1.00E-30	1
cs9-g08	EX152754	conserved hypothetical lipoprotein	1.00E-30	2
cs9-b06	EX152755	metabolite h + major facilitator superfamily	1.00E-50	4
cs9-g02	EX152756	rnd effluxouter membrane	1.00E-38	1
cs9-d03	EX152757	The Betaine/Carnitine/Choline Transporter	1.00E-57	2
cs8-f09	EX152758	hemolysin activator family	1.00E-33	1
cs8-e12	EX152759	taurine abc periplasmic binding protein	1.00E-12	1
cs2-d05	EX152760	transmembrane senso	1.00E-30	2
cs2-g03	EX152761	mitochondrial fl atp synthase beta subunit	1.00E-06	1
cs10-f09	EX152762	dna-binding protein	1.00E-44	1
cs11-b12	EX152763	helix-turn-type; -type transcriptional n-terminal	1.00E-25	2
cs11-c12	EX152764	periplasmic binding protein transcriptional regulator	1.00E-20	2
cs11-c08	EX152765	sigma-54 dependent transcriptional regulator	1.00E-61	1
cs8-f01	EX152766	Sigma-54 specific transcriptionalfis family	1.00E-49	2
cs9-a12	EX152767	Transcriptional family	1.00E-58	2
cs7-g07	EX152768	Transcriptional family	1.00E-39	2
cs2-f08	EX152769	Transcriptional family	1.00E-62	2
cs10-g07	EX152770	Transcriptional family	1.00E-12	2
cs1-f05	EX152771	nucleoside diphosphate kinase regulator	1.00E-47	1
cs8-b09	EX152772	phosphotransferase fructose-specific iibc component	1.00E-38	1
cs9-a07	EX152773	sensor histidine kinase	1.00E-32	2

· 续表 2 ·

克隆名	GenBank 接受号	预测的基因名	最大相似性	出现频率
cs6-c01	EX152774	two-component response regulator	1.00E-20	1
cs9-d07	EX152775	dependent siderophore receptor	1.00E-43	3
cs10-d09	EX152776	dependent receptor	1.00E-66	1
cs11-f08	EX152777	dependent siderophore receptor	1.00E-73	2
cs11-f12	EX152778	dependent receptor	1.00E-15	1
cs13-a06	EX152779	dependent siderophore receptor	1.00E-68	1
cs8-b05	EX152780	dihydroxyacetone kinase	1.00E-54	1
cs8-g04	EX152781	cog2898; uncharacterized conserved protein	1.00E-24	1
cs11-a07	EX152782	uncharacterized protein upf0065	1.00E-20	1
cs11-a11	EX152783	No homologue		3
cs13-c04	EX152784	No homologue		2
cs1-c04	EX152785	No homologue		4
cs10-a11	EX152786	No homologue		2
cs1-d04	EX152787	No homologue		1
cs2-b04	EX152788	No homologue		1
cs2-e02	EX152789	No homologue		1
cs2-h12	EX152790	No homologue		1
cs8-c09	EX152791	No homologue		1
cs8-c11	EX152792	No homologue		3
cs9-c09	EX152793	No homologue		1
cs9-c10	EX152794	No homologue		1
cs9-e07	EX152795	No homologue		1
cs9-f07	EX152796	No homologue		1
cs9-h09	EX152797	No homologue		1
cs10-b08	EX152798	No homologue		1
cs11-b01	EX152799	No homologue		1
cs11-f07	EX152800	No homologue		1
cs13-c11	EX152801	No homologue		1
cs13-h04	EX152802	No homologue		1
cs13-h09	EX152803	No homologue		1

3 讨论

本研究中鉴定分析的部分基因,与目前原核生物的基因比较接近,而撇开原核生物的序列数据库,却不能发现有同源序列。我们不能排除银鲟皮肤和肌肉组织中没有细菌寄生,但由于原核生物的 RNA 是没有 Poly A 的,由于本实验 cDNA 文库构建起始的第一条链的形成是以 Poly T 为引物的,因此,原核生物的 RNA 不可能被克隆进银鲟 cDNA 文库。本研究中,部分基因序列更接近原核生物的序列而没有真核生物的同源序列,也是正常合理的,在其他文献报道中也有类似的情况出现^[10]。有些以前只在原核生物中被发现,且被认为只有原核生物所拥有的序列,后来随着科学研究的深入而发现在真核生物中也普遍存在,如 RNA 聚合酶 III,只在线虫中发现 RNAi (RNA interference) 机制以后,才发现真核生物也拥有与细菌一样的 RNA 聚合酶 III^[11]。

基因表达谱分析是一种有效地开展基因组学研究的有效手段,通过分析组织的基因表达谱不仅可以在整体上初步了解该组织基因的整体表达情况而且可在较短时间内得到大量的 EST (expressed sequence tags),为今后开展如利用基因芯片技术开展基因功能研究提供前期的序列基础^[12]。国外已在斑马鱼 (*Danio rerio*)、鲑鳟鱼类 (salmonid)、斑点叉尾鲟 (*Ictalurus punctatus*)、日本牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、长颌姬虾虎鱼 (*Gillichthys mirabilis*) 等鱼类中开展了各种组织的基因表达谱分析,积累了大量的 ESTs 序列^[10,13-18],国内在银鲫 (*Carassius auratus*) L.、真鲷 (*Chrysophrys major*) 等基因表达谱方面也有一定的研究^[19-20],但相对国外的研究,我国在重要鱼类的基因表达谱的

研究亟需加强。银鲳是十分重要的近海经济鱼类,而且其肉味非常鲜美,目前人们对其遗传信息的了解非常有限,本研究中,我们共得到了 105 个不同的基因表达序列,并初步分析了银鲳皮肤和肌肉组织的基因表达谱组成,为今后开展银鲳遗传方面的研究提供了一定的基础资料。本研究只尝试了少量的序列测定,但已从整体上初步反映出银鲳皮肤和肌肉组织的基因表达组成,本研究所构建的 cDNA 文库和较大规模核酸序列分析的技术,也为今后开展银鲳其它各种组织的基因表达谱研究奠定了前期基础。

参考文献:

- [1] 龚启祥,倪海儿,李伦平,等. 东海银鲳卵巢周年变化的组织学观察[J]. 水产学报,1989,13(4):316-325.
- [2] 倪海儿,龚启祥. 东海银鲳个体生殖力的研究[J]. 浙江水产学院学报,1995,14(2):118-122.
- [3] 施兆鸿,王建钢,高露姣,等. 银鲳繁殖生物学及人工繁育技术的研究进展[J]. 海洋渔业,2005,27(3):246-250.
- [4] 柳卫海,詹秉义. 东海区鲳鱼资源利用现状分析[J]. 湛江海洋大学学报,1999,19(1):30-34.
- [5] 舒黎明,邱永松. 珠江河口及其附近水域银鲳生长与死亡参数估计[J]. 水产学报,2005,29(2):193-197.
- [6] 曾 玲,金显仕,李富国. 黄海南部银鲳的生殖力及其变化[J]. 海洋水产研究,2005,26(6):1-6.
- [7] 何正佩,孙振中,洪 波. 长江口南岸水域银鲳及幼鱼资源动态监测[J]. 水产科技情报,2006,33(2):81-83.
- [8] 龚小玲,鲍宝龙,杨桂梅,等. 牙鲆变态早期 cDNA 文库的构建和 parvalbumin 基因的克隆[J]. 水产学报,2005,29(4):467-472.
- [9] 鲍宝龙,杨桂梅,施志仪,等. 抑制差减杂交法克隆牙鲆变态早期差异表达的基因[J]. 水产学报,2006,30(2):204-210.
- [10] Karsi A, Cao D, Li P, *et al.* Transcriptome analysis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): initial analysis of gene expression and microsatellite-containing cDNAs in the skin[J]. *Gene*,2002,285:157-168.
- [11] Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. *Nature*, 2001,409:363-366.
- [12] Mekhedov S, de Ilarduya O M, Ohlrogge J. Toward a functional catalog of the plant genome. A survey of genes for lipid biosynthesis[J]. *Plant Physiol*,2000,122:389-401.
- [13] Ton C, Stamatiou D, Dzau V J, *et al.* Construction of a zebrafish cDNA microarray: gene expression profiling of the zebrafish during development[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2002,296:1134-1142.
- [14] Rise M L, von Schalburg K R, Brown G D, *et al.* Development and application of a salmonid EST database and cDNA microarray: data mining and interspecific hybridization characteristics[J]. *Genome Res*,2004,14:478-490.
- [15] Mackenzie S, Iliev D, Liarte C, *et al.* Transcriptional analysis of LPSstimulated activation of trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocyte/macrophage cells in primary culture treated with cortisol[J]. *Mol Immunol*,2005,43:1340-1348.
- [16] Kurobe T, Yasuike M, Kimura T, *et al.* Expression profiling of immune-related genes from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* kidney cells using cDNA microarrays[J]. *Dev Comp Immunol*,2005,29:515-523.
- [17] Moens Lotte N, van der Ven K, Van Remortel P, *et al.* Expression profiling of endocrine-disrupting compounds using a customized *Cyprinus carpio* cDNA microarray[J]. *Toxicol Sci*,2006,93(2):298-310.
- [18] Gracey A Y, Troll J V, Somero G N. Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2001,98:1993-1998.
- [19] Zhang Y B, Gui J F. Identification and expression analysis of two IFN-inducible genes in crucian carp (*Carassius auratus* L.) [J]. *Gene*, 2004,325:43-51.
- [20] Chen S L, Zhang Y X, Xu M Y, *et al.* Molecular polymorphism and expression analysis of MHC class II B gene from red sea bream (*Chrysophrys major*) [J]. *Dev Comp Immunol*,2006,30(4):407-418.