

文章编号: 1674 - 5566(2012)01 - 0021 - 07

草鱼 *JAK2* 基因片段序列的克隆及其组织表达分析

吴小凤, 李小勤, 冷向军, 关磊, 郭婷

(上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 通过实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 法从草鱼肝脏中首次克隆获得草鱼 *JAK2* 基因的片段序列。该片段序列长 671 bp, 编码 223 个氨基酸, 氨基酸序列分析表明草鱼 *JAK2* 基因片段与其他物种的相似性在 70% ~ 91% 之间; 系统进化树显示, 鱼类的 *JAK2* 独立聚成一支, 草鱼与斑马鱼聚成一支, 与鳊鱼和墨绿凹鼻鲀聚成一支再聚成一支。实时荧光定量 PCR 分析表明, 草鱼 *JAK2* 基因在肝脏、肌肉、脑、心脏、脾脏和肠系膜脂肪组织中均有表达, 其中在肝脏组织中表达量最高, 显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 其次是肌肉、脑、脾脏和肠系膜脂肪组织, 在心脏组织中表达量最低, 且显著低于其他组织 ($P < 0.05$)。本研究为进一步研究草鱼 *JAK2* 基因的结构和功能奠定了基础。

研究亮点: *JAK2* 基因在鱼类上的研究报道甚少。本研究首次克隆了草鱼 *JAK2* 基因片段序列; 且发现 *JAK2* 基因在肝脏组织中表达量最高, 心脏组织中表达量最低, 为草鱼 *JAK2* 基因的结构及其信号转导等生理功能的深入研究奠定了基础。

关键词: 草鱼; *JAK2*; 基因克隆; 实时荧光定量 PCR; 组织表达

中图分类号: S 917

文献标志码: A

JAK (Janus kinase) 是一种蛋白酪氨酸激酶, 迄今为止共发现有 4 个家族成员, 即 *JAK1*、*JAK2*、*JAK3* 和 *TyK2*, 它可在细胞因子受体与相应配基结合后活化, 进而激活“信号转导和转录激活子” (Signal Transducer and Activator of Transcription, STAT) 而诱导目的基因表达, 从而调节机体的生理作用^[1]。

迄今为止, *JAK2* 在人及小鼠等其他哺乳动物上研究比较深入。*JAK2* 作为 *JAK* 家族成员之一, 为非受体型酪氨酸激酶, 位于人类 9 号染色体 (9p23-p24)^[2], 广泛分布于多种组织细胞中^[2-4], 并在动物机体的胚胎发育^[5-6]、造血调节^[7-8] 以及瘦素调节^[9-14] 中起着非常重要的作用, 尤其其抑制因子在治疗骨髓增殖性疾病的临床应用最受关注^[15]。研究发现, 当人体内 *JAK2* 基因突变成 *JAK2V617F* 基因, 可引起 *JAK2* 激酶及下游信号通路的持续活化, 导致细胞恶性增殖

和凋亡抑制, 最终引起骨髓增殖性疾病的发生^[16-19]。在水产动物上, 关于 *JAK2* 的研究报道较少, 目前仅见墨绿凹鼻鲀 (*Tetraodon fluviatilis*)^[20]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[21-22]、鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*)^[23] 等少数鱼类的相关文献, 研究发现其在斑马鱼的造血功能^[21] 和免疫因子干扰素的信号转导功能^[22] 上起着极其重要的作用。

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 作为我国传统淡水养殖的四大家鱼之一, 是我国重要的经济养殖鱼类, 但由于在养殖过程中配合饲料脂肪比例不当、养殖密度过大以及养殖环境恶化等原因, 导致草鱼易出现过度肥胖、脂肪肝及相关疾病的发生。*JAK2* 作为瘦素^[9-14] 及干扰素^[18] 信号转导的参与者之一, 在鱼类的脂肪代谢和免疫调节中起着极其重要的作用。但目前 *JAK2* 在草鱼上尚无相关研究报道。本研究通过设计简并引物, 运用 RT-PCR 法克隆草鱼 *JAK2* 基因片段序列, 并运

收稿日期: 2011-06-05 修回日期: 2011-09-12

基金项目: 上海市教育委员会发展基金 (06KZ002); 上海海洋大学“教育部水产种质资源发掘与利用省部共建重点实验室”及“农业部水产种质资源与利用重点开放实验室”开放课题基金 (KFT2008-6); 中国南海水产研究所种质资源开放课题 (2008A003); 上海市重点学科建设项目 (Y1101)

作者简介: 吴小凤 (1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物分子营养学。E-mail: wxf.0596@163.com

通讯作者: 李小勤, E-mail: xqli@shou.edu.cn

用实时荧光定量 PCR 分析草鱼 *JAK2* 基因的组织差异表达,旨在了解草鱼 *JAK2* 基因的结构、功能,以期能为 *JAK2* 基因的全长克隆及其在草鱼及其它鱼类上的信号通路调控等生理功能的深入研究提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

试验用草鱼三尾,体重约 750 g 左右,均来自上海海洋大学特种养殖场。对鱼体进行酒精消毒后,分别采其肌肉、肝脏、脾、心脏、脑、肠系膜脂肪组织于液氮中冷冻,24 h 后转入 -80℃ 超低温冰箱中待用。

1.2 主要试剂与仪器

RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂、Reverse Transcriptase M-MLV、Ribonuclease Inhibitor、Ex Taq 酶、DNA Marker、SYBR[®] Premix Ex Taq (Perfect Real Time) 均为 TaKaRa 公司产品;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、pGM-T 克隆试剂盒、TOP10 感受态细胞、Agarose 琼脂糖、IPTG、X-Gal 均为天根生化科技公司产品;LB 培养基为上海生工公司产品;其它试剂均为分析纯,购自国药集团。

台式高速冷冻离心机(5810R)、梯度 PCR 仪(5345)均为德国 eppendorf 公司产品;蛋白核酸分析仪(Smart SpecTM plus)、凝胶成像系统(Biorad GelDoc XR)、荧光定量 PCR 仪(iQ-5)均为美国 Bio-Rad 公司产品;电泳仪(CYY-6C)为北京六一仪器厂产品。

1.3 肝脏组织总 RNA 提取及反转录反应

从 -80℃ 超低温冰箱中取出草鱼组织,总 RNA 提取按 TaKaRa RNAiso Plus RNA 提取试剂说明书进行,再利用蛋白核酸分析仪和琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 纯度和质量。选取 28S 和 18S 两条带清晰完整,且 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8 ~ 2.0 之间的总 RNA 进行反转录反应,按照 TaKaRa PrimeScript Reverse Transcriptase(反转录酶)推荐的方法以 Oligo(dT) 为引物合成 cDNA 第一链。

1.4 引物设计与 PCR 扩增反应

根据已报道的斑马鱼 *Danio rerio* (GenBank: AB018218.1), 鳊鱼 *Siniperca chuatsi* (GenBank: FJ629182.1), 人 *Homo sapiens* (GenBank:

AF001362.1)、小鼠 *Mus musculus* (GenBank: NM_008413.2) 等物种的 *JAK2* 基因保守区序列设计简并引物 *JAK2-F1*, 5'-GAYGCVCAAYCAYTACCTYTG-3' 和 *JAK2-R1*, 5'-CTCATCATRCTKGCHGCTC-3'。设计的引物由上海生工生物工程有限公司合成。

PCR 扩增采用 25 μL 反应体系, 10 × Ex Taq Buffer (Mg²⁺ Plus) 2.5 μL, dNTP (各 2.5 mmol/L) 2 μL, 上下游引物各 0.5 μL (10 μmol/L), Ex Taq 酶 0.2 μL, 模板 1 μL, RNase free dH₂O 18.3 μL。PCR 扩增条件为 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后, 鉴定其亮度和特异性。

1.5 目的基因的回收与克隆

根据琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书回收纯化目的基因, 后按照载体与片段的摩尔比在 1:3 ~ 1:8 的添加量将回收产物与 pGM-T 载体进行 16℃ 连接过夜, 连接产物与 TOP10 感受态细胞混匀后, 37℃ 150 r/min 振荡培养 50 min, 使菌体复苏, 后涂布于含有 IPTG、X-gal 和氨苄青霉素的 LB 固体培养基中 37℃ 过夜培养。次日于长有蓝白斑菌落的平板中, 挑取 7 个白色菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中 37℃ 150 r/min 振荡培养过夜, 后通过菌液 PCR 验证目的片段插入效果, 从而筛选出阳性重组克隆, 送上海生工生物工程有限公司测序。

1.6 *JAK2* 基因片段序列分析

所获片段序列运用序列处理在线工具包 SMS (The Sequence Manipulation Suite) 将核苷酸序列翻译成氨基酸序列。应用 BLASTP 程序搜索 GenBank 的 Non-redundant protein sequences (nr) 数据库, 进行氨基酸序列同源性分析, 再用 MEGA4 软件绘制 *JAK2* 基因片段氨基酸序列的分子系统进化树。

1.7 实时荧光定量 PCR

根据克隆获得的草鱼 *JAK2* 基因片段序列设计荧光定量 PCR 引物, *JAK2-F2*: 5'-GAGAATGG CGACTACAATC-3'; *JAK2-R2*: 5'-GAACAGCACC TGCTAAACTG-3', 扩增片断长度为 147 bp。内参基因根据草鱼 β -actin (DQ211096.1), 设计引物 β -actin-F: 5'-GCTCTGCTATGTGGCTCTTGAC-3'; β -actin-R: 5'-CTCTGGGCACCTGAACCTCT-3', 扩增片段长度为 152 bp。所有引物由上海生工生

物工程有限公司合成。

实时荧光定量 PCR 根据 TaKaRa SYBR[®] Premix Ex *Taq* (Perfect Real Time) 试剂盒说明书进行,采用 20 μ L 反应体系,SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] (2 \times) 10 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L,各组织 cDNA 模板 2 μ L,ddH₂O 7 μ L。荧光定量 PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,40 个循环;后 55~95 $^{\circ}$ C 10 s 进行熔解曲线检测。每个样本进行 3 个重复,空白对照采用 ddH₂O 作为模板。

通过标准曲线的制作来检测实时荧光定量 PCR 引物的特异性和试验的可靠性。选用肝脏组织的 cDNA 为模板,荧光定量 PCR 引物 *JAK2*-F2、*JAK2*-R2 和 β -actin-F、 β -actin-R 进行普通 PCR,凝胶电泳后割胶回收纯化目的基因和内参基因的 PCR 产物,纯化产物进行 10 倍的系列稀释,选取合适的浓度梯度进行实时荧光定量 PCR 反应,以各浓度模板的 Ct 值位于 15~30 之间为宜,分别制作目的基因 *JAK2* 和内参基因 β -actin 的标准曲线。

1.8 *JAK2* 基因相对定量的计算

JAK2 基因的表达量采用 Livak 法计算,即以草鱼 β -actin 基因为内参,对得到的各组织样品 Ct 值进行均一化处理,并以各组织中的最低表达量为基准,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法确定 *JAK2* 基因在不同组织中的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *JAK2* 基因片段序列分析

克隆获得的 *JAK2* 基因片段经测序后,采用 SMS 在线工具包进行序列分析,结果表明(图 1),草鱼 *JAK2* 基因部分序列长度 671 bp,编码 223 个氨基酸。

2.2 *JAK2* 基因片段序列的同源性比较及系统进化树构建

使用 BLASTP 程序搜索 GenBank 的 Non-redundant protein sequences (nr) 数据库,结果表明,草鱼 *JAK2* 基因片段氨基酸序列与斑马鱼 *Danio rerio* (GenBank: BAH47262. 1)、鳊鱼 *Siniperca chuatsi* (GenBank: ACU12481. 1)、墨绿凹鼻鲀 *Tetraodon fluviatilis* (GenBank: AAD56051.2)、褐鼠 *Rattus norvegicus* (GenBank: NP_113702. 1)、

```

1 D A H H Y L C K D V V P P H L L E A I E S Y C H G
1 g a c g c a t c a t t a c c t t t g c a a g a t g t c g t c c a c c a c a t c t g t a g a g c c a c a g a g a g c t a c t g c a c c g g g
26 P I S M E F A I S K L R K S G N Q R C L F V L R C
76 c c a a t a t c a a t g g a g t t g c g a t c a g t a a c t a c g c a a g t c a g g a a c c a g a g a g t c t c t c t a c t c c g g t g c
51 S P K E F N K Y F L T L A V G A Y E D V E Y K H C
151 a g c c c a a a g a a t t c a a c a a a t c t c t g a c t c t g c a g t t g g e g c g t a g g a c g t a g a g t a c a g a c a c t g c
76 L I T R S E N G D Y N L S G T K R S F R S L Q E L
226 c t g a t c a c c a g g t c a g a a t g g c a c t a c a a t c t a g t g g a c c a a a g g a g t t t a g a a c c t a c a g g a g c t g
101 L K C Y Q K E T V K S D C V I F Q F S R C C S P K
301 c t c a a g t t a c c a g a a g a a c a g t a a a a t c a g a t g g t g t c a t c t t t c a g t t t a g c a g g t g c t g t t c g c c a a a g
126 A K E K S S L L V C R S H R G L E V P L S P S L Q
451 a g a c a c a c a t c a g t c a g t g g t a t t c a c a a a t c a g a a a g a a c o c t t g a t c t t g g t a g a g t c a a g g t c a g
176 G T F T K I F K G I R K E Q C D Y C E T H K T E V
526 g g c a a t t c a c a a g a t c t c a a a g g a t c g g a a g a c a g g a g a c t a g a a a c t a a a g a c t a a g a g t c a g t c
201 I V K V L D K A H R N Y S E S F F E A A S K H
601 a t t g t c a a a g t t t g g a c a a g c a c a g a a a t t a c t c t g a g t c t t c t t t g a g c a g c a g c a t g a t g a g

```

图 1 草鱼 *JAK2* 基因部分序列及其编码氨基酸序列的推测

Fig. 1 The partial nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of grass carp *JAK2* gene

小鼠 *Mus musculus* (GenBank: NP_001041642. 1)、牛 *Bos taurus* (GenBank: XP_002689649. 1)、猪 *Sus scrofa* (GenBank: NP_999278. 1)、鸡 *Gallus gallus* (GenBank: CAJ47420. 1)、猕猴 *Macaca mulatta* (GenBank: XP_001082883. 1)、人 *Homo sapiens* (GenBank: AAC23982. 1)、非洲爪蟾 *Xenopus laevis* (GenBank: NP_001085288. 3)、黑猩猩 *Pan troglodytes* (GenBank: XP_001139368. 1) 和珍珠鸟 *Taeniopygia guttata* (GenBank: XP_002195436. 1) *JAK2* 氨基酸相似性分别达到: 91%、77%、74%、72%、71%、71%、71%、71%、71%、70%、70%、70%、70%、70%。经分析表明本实验克隆的 *JAK2* 基因片段在氨基酸水平上与其它物种的 *JAK2* 基因具有高度的保守性。应用 MEGA4 软件以邻位相接 (Neighbor Joining, N-J) 法构建各物种 *JAK2* 基因片段氨基酸的系统进化树,结果显示(图 2),鱼类的 *JAK2* 独立聚成一支,草鱼与同科的斑马鱼聚成一支,后与鳊鱼和墨绿凹鼻鲀聚成的一支再聚成一支,符合物种传统的形态学和生化特征分类进化地位。

2.3 *JAK2* 基因的组织表达实时荧光定量 PCR 分析

以梯度稀释后的纯化产物为模板,通过引物 β -actin-F、 β -actin-R 和 *JAK2*-F2、*JAK2*-R2 进行实时荧光定量 PCR,制作内参基因 β -actin 和目的基因 *JAK2* 的标准曲线,结果显示, β -actin 和 *JAK2* 基因的扩增效率分别为 95.9% 和 99.8%,标准曲线的相关系数分别为 0.999 和 0.997,溶解峰只出现单一的重叠峰,未出现非特异性扩增,表明

试验条件达到实验要求,可靠性较高。

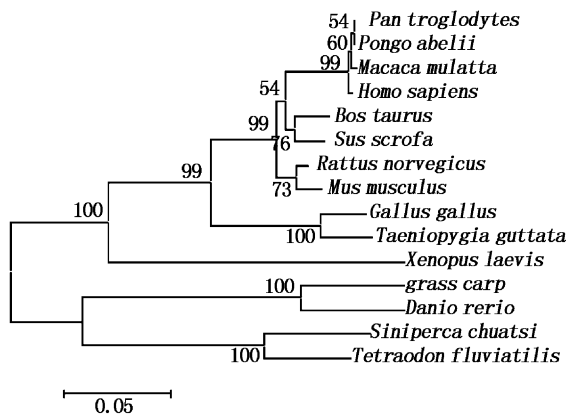


图2 根据 NJ 法构建 *JAK2* 氨基酸序列系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree drawn with Neighbor-Joining method based on the amino acid sequence of *JAK2*

通过实时荧光定量 PCR 检测草鱼各组织的 *JAK2* 基因相对表达量,结果表明(图 3),草鱼 *JAK2* 基因在肝脏、肌肉、脑、心脏、脾脏和肠系膜脂肪组织均有表达,尤其在肝脏组织中表达量最高,显著高于其他组织($P < 0.05$),其次是肌肉、脑、脾脏和肠系膜脂肪组织,在心脏组织中表达量最低,显著低于其他组织($P < 0.05$)。

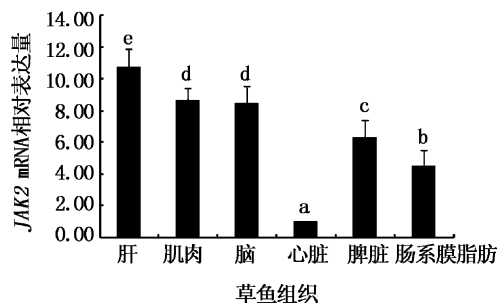


图3 草鱼 *JAK2* 基因的组织表达分析
Fig. 3 Expression analysis of *JAK2* gene in various tissues from grass carp

图中数值为平均值 \pm 标准差;小写字母不同代表显著差异 ($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 *JAK2* 基因片段氨基酸序列的同源性比较

研究表明,不同物种间 *JAK2* 基因存在着较高的同源性,且亲缘关系越近,保守性越高。在氨基酸水平上,人的 *JAK2* 基因与猪和鼠的相似性均为 95%^[3],大鼠的 *JAK2* 基因与小鼠的相似

性为 97.1%^[4];河豚的 *JAK2* 基因与鼠的相似性为 66.8%^[16],鳊鱼的 *JAK2* 基因与河豚的相似性为 89%^[19]。本实验首次克隆获得草鱼 *JAK2* 基因片段序列,长度为 671 bp,编码 223 个氨基酸,氨基酸序列比对显示,草鱼 *JAK2* 基因的氨基酸序列与其他物种间具有较高的同源性,与斑马鱼、鳊鱼、墨绿凹鼻鲀、鸡、人、鼠等 13 种物种的相似性均高于 70%,尤其与斑马鱼相似性最高,达 91%,这种相似性与物种本身的分类地位很吻合,草鱼与同为鲤科鱼类的斑马鱼亲缘关系相对较近,而与脂科鱼类鳊鱼和鲀科鱼类河豚的关系较远,与鸡、鼠、人、猪等动物的亲缘关系则更远。系统进化树分析表明,草鱼 *JAK2* 与斑马鱼聚为一支,与鳊鱼和墨绿凹鼻鲀聚成一支再聚成一支,哺乳动物独立聚成一支,符合物种分子进化关系。

3.2 *JAK2* 基因的组织表达分析

在人及其它动物上的研究表明,*JAK2* 广泛分布于动物机体的多种组织中。利用 Northern 印迹检测发现,人的 *JAK2* 在心脏、脑、胎盘、肺、肝脏、骨骼肌、肾脏、胰腺、脾脏、胸腺、睾丸、卵巢、小肠、结肠和外围血淋巴中均有表达,且主要在脾、外围血淋巴中和睾丸组织中表达,其次是心脏和肌肉组织,而在其它组织中只有微量表达^[3];大鼠 *JAK2* 基因也在多种组织中均有表达,其中在脑和脾脏组织中表达量最高,肌肉和睾丸组织次之,在肾脏、心脏、肺和肝脏组织中表达量最少^[4]。在鱼类上,*JAK2* 基因也在多种组织中均有表达,但是不同鱼类间存在差异。GUO 等^[23]通过实时定量 PCR 分析表明,鳊鱼 *JAK2* 基因在性腺、肝脏、鳃、脑、脾、心脏、肠、后肾、前肾组织中都有表达,尤其在性腺中表达最高,但是在肌肉中却不见表达。本试验通过实时荧光相对定量 PCR 对草鱼 *JAK2* 基因在不同组织中的 mRNA 表达量进行分析,结果表明,*JAK2* 基因在草鱼肝脏、肌肉、脑、心脏、脾脏和肠系膜脂肪组织中均有表达,尤其是在肝脏中表达量最高,其次是肌肉、脑、脾脏和肠系膜脂肪组织,在心脏组织中表达量最低。这种不同鱼类间 *JAK2* 基因表达的差异性,原因在于不同鱼类间可能确实存在基因表达的种属差异性,同时也说明 *JAK2* 基因表达随物种所处的个体发育、生长阶段、繁殖季节等因素的不同而不同。

3.3 *JAK2* 在信号转导中的功能

作为一种非受体型酪氨酸激酶,正常的 *JAK2* 可被白细胞介素^[24-25]、表皮生长因子^[26]和血管紧张素 II^[27-28]等多种细胞因子激活,进而磷酸化各种靶蛋白的酪氨酸残基来实现信号转导作用,从而调节动物机体的各种生理功能。

在人及其他动物上的研究发现,*JAK2* 参与了胚胎发育^[9-10]、骨骼肌发育和能量代谢^[29]、造血干细胞增殖与分化^[16-19]以及瘦素调节^[9-14]等过程。在胚胎发育过程中,胚胎中的 *JAK2* 蛋白一旦失活就会导致死亡^[4-5]。*JAK2* 参与的 *JAK2/STAT3* 信号通路可通过降低骨骼肌发育相关基因 *MyoD* 和 *Myf5* mRNA 表达量和能量代谢相关基因 *LXR α* 和 *UCP3* mRNA 表达量来调节骨骼肌发育和能量代谢^[29]。而在造血细胞的增殖与分化方面,大量研究报道认为 *JAK2* 基因突变为 *JAK2V617F* 会导致骨髓增殖性疾病的产生^[16-19]。*JAK2* 还参与了瘦素调节。大量研究表明,*JAK2-STAT3* 通路活性下降、失活或者调节异常都会导致瘦素不能有效地发挥其生理作用,包括癌细胞增殖^[9-10]、免疫调节^[11-12]、生殖功能^[13]和脂肪代谢^[14]等。尤其是脂肪代谢方面,通过采用 *JAK2* 抑制剂 AG490 来阻断 *JAK-STAT3* 通路可以减弱瘦素对原代大鼠脂肪细胞中脂滴包被蛋白(perilipin) mRNA 表达的抑制作用,引起脂滴表面动力学平衡的改变从而影响脂肪代谢^[14]。

在水产动物上,*JAK2* 的研究较少,仅见河豚、斑马鱼、鳊鱼上有报道,且主要集中在血管发生和免疫调节两个方面。2000年,LEU等^[20]报道了河豚中 *JAK2* 基因的结构,这是在鱼类上首次发现并报道了 *JAK2* 基因的存在。2009年,SUNG等^[21]通过研究发现 *JAK2a* 在斑马鱼的造血作用和血管构成中起着至关重要的作用,于斑马鱼的受精卵中注射合成的 *JAK2a* shRNA(短发夹RNA),24 h 后发现胚胎中血液循环被抑制,8 d 内所有的胚胎都死亡,并伴随着心包膜放大、体长缩短和一些脉管系统缺陷;而在敲除斑马鱼胚胎中的 *JAK2a* 36 h 后,Ba1 球蛋白显著降低,72 h 后,血管构造则被扰乱。另 *JAK2* 还参与了鱼类免疫调节功能。AGGAD等^[22]研究发现 *JAK2a* 参与了斑马鱼免疫因子干扰素- γ 的信号转导。GUO等^[23]也通过研究发现多聚次黄苷酸-胞苷

酸[poly(I:C)]可通过诱导提高鳊鱼 *JAKs* 和除 *STAT5* 外的 *STATs* 的 mRNA 表达量,进而提高细胞内免疫因子 IRF-1, Mx, SOCS1 和 SOCS3 基因的表达量,从而提高鱼体的免疫应答。

目前为此,*JAK2* 基因在草鱼及其他鱼类上的研究还比较局限,鱼类 *JAK2* 及其家族成员是否也像在哺乳动物上一样发挥着其他方面尤其是脂肪代谢中瘦素的信号转导等生理功能,值得深入研究。本次实验结果为草鱼 *JAK2* 的结构及草鱼和其他鱼类的过度肥胖、脂肪肝及相关疾病的治疗奠定了基础。

参考文献:

- [1] HOU S X, ZHENG Z, CHEN X, et al. The *JAK/STAT* pathway in model organisms: Emerging roles in cell movement[J]. *Developmental Cell*, 2002, 3(6): 765-778.
- [2] DALAL I, ARPAIA E, DADI H, et al. Cloning and characterization of the human homolog of mouse *JAK2* [J]. *Blood*, 1998, 91(3): 844-851.
- [3] SALTZMAN A, STONE M, FRANKS C, et al. Cloning and characterization of human *Jak-2* kinase: High mRNA expression in immune cells and muscle tissue [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 246(3): 627-633.
- [4] NEUBAUER H, HUFFSTADT U, MULLER M, et al. Embryonic lethality in mice deficient in Janus kinase 2 (*JAK2*) [J]. *Immunology Letters*, 1997, 56: 275.
- [5] DUHE R J, RUI H, GREENWOOD J D, et al. Cloning of the gene encoding rat *JAK2*, a protein tyrosine kinase [J]. *Gene*, 1995, 158(2): 281-285.
- [6] FRENZEL K, WALLACE T A, MCDOOM I, et al. A functional *JAK2* tyrosine kinase domain is essential for mouse development [J]. *Experimental Cell Research*, 2006, 312(15): 2735-2744.
- [7] RADOSEVIC N, WINTERSTEIN D, KELLER J R, et al. *JAK2* contributes to the intrinsic capacity of primary hematopoietic cells to respond to stem cell factor [J]. *Experimental Hematology*, 2004, 32(2): 149-156.
- [8] 赵声明,常乃柏,顾惜春. 转导 *JAK2* 基因可促进原始多能造血细胞在体外的长期扩增 [J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(11): 949-953.
- [9] 肖维,刘义,龚成,等. *JAK2/STAT3* 信号传导通路在瘦素促进子宫内膜癌细胞增殖中的作用 [J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2008, 37(3): 354-357.
- [10] 韩国胜,岳志健,周晓平,等. Leptin 促进人脑胶质瘤生长及其机制研究 [J]. *肿瘤*, 2010, 30(9): 735-739.
- [11] MURAOKA O, XU B, TSURUMAKI T, et al. Leptin-induced transactivation of NPY gene promoter mediated by *JAK1*,

- JAK2 and *STAT3* in the neural cell lines[J]. *Neurochemistry International*, 2003, 42(7): 591–601.
- [12] 侯丽颖, 贺松其, 文彬, 等. 保肝宁对瘦素刺激 HSC 增殖及其 *JAK2-STAT3* 信号通路影响的实验研究[J]. *上海中医药杂志*, 2007, 41(3): 60–62.
- [13] 刘义, 尹婕, 吕立群, 等. 卵巢黄素化颗粒细胞瘦素信号转导分子 *STAT3* 磷酸化在多囊卵巢综合征发病中的作用[J]. *生殖与避孕*, 2007, 27(11): 692–694.
- [14] 张明涛, 鞠大鹏, 杨永青, 等. Leptin 通过 *JAK2-STAT3* 通路抑制原代大鼠脂肪细胞 *perilipin* mRNA 的表达[J]. *西北农林科技大学学报*, 2009, 37(4): 25–30.
- [15] SANTOSF P, VERSTOVSEK S. *JAK2* inhibitors: What's the true therapeutic potential[J]. *Blood Reviews*, 2011, 25(2): 53–63.
- [16] LEVINE R L, WADLEIGH M, COOLS J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase *JAK2* in polycythemia vera, Essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis[J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(4): 387–397.
- [17] IHLE J N, GILLILAND D G. *JAK2*: Normal function and role in hematopoietic disorders [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2007, 17(1): 8–14.
- [18] 徐祖琼, 孙雪梅, 欧阳建, 等. 真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性骨髓纤维化患者骨髓病理特点及 *JAK2* 突变[J]. *实用医学杂志*, 2008, 24(20): 3481–3483.
- [19] SIEMIATKOWSKA A, BIENIASZEWSKA M, HELLMANN A, et al. *JAK2* and *MPL* gene mutations in V617F-negative myeloproliferative neoplasms[J]. *Leukemia Research*, 2010, 34(3): 387–389.
- [20] LEU J H, YAN S J, LEE T F, et al. Complete genomic organization and promoter analysis of the round-spotted Pufferfish *JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, and *TYK2* genes [J]. *DNA and Cell Biology*, 2000, 19(7): 431–446.
- [21] SUNG J J, JEON J, LEE J J, et al. Zebra fish *JAK2a* plays a crucial role in definitive hematopoiesis and blood vessel formation [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 378(3): 629–633.
- [22] AGGAD D, STEIN C, SIEGER D, et al. In vivo analysis of *Ifn-γ1* and *Ifn-γ2* signaling in zebrafish [J]. *Journal of Immunology*, 2010, 185(11): 6774–6782.
- [23] GUO C J, ZHANG Y F, YANG L S, et al. The *JAK* and *STAT* family members of the mandarin fish *Siniperca chuatsi*: Molecular cloning, tissues distribution and immunobiological activity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(2): 349–359.
- [24] ITO T, IKEDA K, TOMITA K, et al. Interleukin-6 upregulates the expression of PMP22 in cultured rat Schwann cells via a *JAK2*-dependent pathway [J]. *Neuroscience Letters*, 2010, 472(2): 104–108.
- [25] YAMAMOTO K, SHIBATA F, MIURA O, et al. Physical interaction between interleukin-12 receptorβ2 subunit and *JAK2* tyrosine kinase: *JAK2* associates with cytoplasmic membrane-proximal region of interleukin-12 receptorβ2 via amino-terminus [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 257(2): 400–404.
- [26] COLOMIERE M, FINDLAY J, ACKLAND L, et al. Epidermal growth factor-induced ovarian carcinoma cell migration is associated with *JAK2/STAT3* signals and changes in the abundance and localization of α6β1 integrin [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2009, 41(5): 1034–1045.
- [27] MCWHINNEY C D, HUNT R A, CONRAD K M, et al. The type I angiotensin II receptor couples to Stat1 and Stat3 activation through *JAK2* kinase in neonatal rat cardiac myocytes [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 1997, 29(9): 2513–2524.
- [28] WALLACE T A, XIA S L, SAYESKI P P. *JAK2* tyrosine kinase prevents angiotensin II-mediated inositol 1, 4, 5 trisphosphate receptor degradation [J]. *Vascular Pharmacology*, 2005, 43(5): 336–345.
- [29] 马佩云, 孙超, 张忠品, 等. *JAK2/STAT3* 信号通路对小鼠骨骼肌发育和能量代谢相关基因 mRNA 表达的影响 [J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18(5): 951–955.

Cloning and tissue expression of *JAK2* gene in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

WU Xiao-feng, LI Xiao-qin, LENG Xiang-jun, GUAN Lei, GUO Ting

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China)

Abstract: The *JAK2* (Janus kinase 2) gene fragment sequence was cloned from liver of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by RT-PCR. The obtained cDNA fragment sequence was 671 bp, which encoded 223 amino acids. The amino acid sequence comparison results showed that the *JAK2* amino acid of grass carp shared 70% – 91% identity with other species. Phylogenetic tree of *JAK2* generated by Neighbor Joining method suggested that all teleosts cluster together, and the grass carp *JAK2* is clustered closely with that of zebrafish, mandarin fish and globefish. Then the expressions of different tissues including liver, muscle, brain, heart, spleen and mesentery fat tissue were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that the *JAK2* gene of grass carp expressed in all tissues and highest in liver ($P < 0.05$), lower in muscle, brain, spleen and fat tissue, lowest in heart ($P < 0.05$). This study will be helpful for further understanding the structure and function of *JAK2* in *C. idella*.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *JAK2*; gene cloning; real-time PCR; tissue expression