

文章编号: 1674-5566(2013)03-0321-07

## 斑马鱼 *HCS* 基因全长 cDNA 序列及早期仔鱼阶段的空间表达

王燕飞<sup>1</sup>, 徐义平<sup>2</sup>, 鲍宝龙<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 乐清市水产科学研究所, 浙江 乐清 325600)

**摘要:** 蛋白生物素酰化发挥重要的生理作用, 羧化酶和组蛋白生物素酰化主要依赖于羧化全酶合成酶 (holocarboxylase synthetase, HCS)。首次克隆了 *HCS* 基因全长序列 2 942 bp, 其编码 829 个氨基酸, 含有 BirA 功能结构域。利用 RNA 整体原位杂交技术, 检测 *HCS* 基因在斑马鱼早期发育过程中的空间表达, 发现 *HCS* 基因在脑、脊髓、鳃、心脏、肠道和肌肉等组织中表达。在肌肉组织中, *HCS* 基因在初孵仔鱼的肌节表达, 而在孵化后第 6 天仔鱼中, *HCS* 基因则集中在每一肌节的中部表达。这些结果, 为进一步了解 *HCS* 的功能奠定了基础。

**研究亮点:** 关于催化蛋白生物素酰化的关键酶类——羧化全酶合成酶 (HCS) 在鱼类中的作用研究很少。本文首次克隆了斑马鱼全长 *HCS* 基因, 并发现其在早期仔鱼阶段肌节中的表达型式存在非常有意思的变化。

**关键词:** 羧化全酶合成酶; 斑马鱼; 生物素酰化; RNA 原位杂交

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

生物素即维生素 B7, 又称维生素 H 或辅酶 R, 通过羧化全酶合成酶 (holocarboxylase synthetase, HCS) 与丙酰辅酶 A 羧化酶、丙酮酸羧化酶、 $\alpha$ -甲基巴豆酰辅酶 A 羧化酶和乙酰辅酶 A 羧化酶共价结合, 在脂肪酸合成葡萄糖异生作用、以及几种支链氨基酸和奇碳链脂肪酸的分解代谢等方面发挥作用<sup>[1-3]</sup>。生物素缺乏时, 会导致细胞增殖减缓, 免疫功能下降, 胚胎发育异常的现象<sup>[4-7]</sup>。生物素还在转录和翻译水平影响基因的表达, 参与有关营养代谢的调控<sup>[8]</sup>。此外, 组蛋白生物素酰化在细胞增殖、DNA 修复、维持基因组稳定等方面发挥作用<sup>[9-12]</sup>。组蛋白生物素酰化是一种新的组蛋白修饰现象, 可为理解营养与表观遗传的关系提供新的视角。

目前关于组蛋白生物素酰化的研究, 主要在人细胞系中开展, 在鱼类中还没有报道, 也不清楚发育过程中组蛋白生物素酰化修饰的作用。组蛋白生物素酰化主要依赖于羧化全酶合成酶 (HCS) 的催化, 人 HCS 可直接与组蛋白 H3 相互

作用进行反应<sup>[13-14]</sup>, 微小 RNA 可通过调控人 *HCS* 基因的表达来影响组蛋白的生物素酰化<sup>[15-16]</sup>。目前针对鱼类 *HCS* 基因的研究还很少<sup>[17]</sup>, 为了今后更好地了解 HCS 及组蛋白生物素酰化在鱼类发育过程中的作用, 本研究克隆了斑马鱼 *HCS* 基因全长 cDNA 序列, 并初步调查了其在早期仔鱼的空间表达分布。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

试验用 AB 系斑马鱼 (*Danio rerio*) 饲养在自动化控制水循环系统中, 仔鱼和成鱼饲养水温均为 28 °C。

#### 1.2 总 RNA 提取和全长 cDNA 克隆

Trizol (Invitrogen 公司) 法提取斑马鱼成体的总 RNA, 并经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。以 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 5'RACE 试剂盒的逆转录酶进行单链 cDNA 扩增。根据斑马鱼 HCS 的 cDNA 序列片段

收稿日期: 2012-11-11 修回日期: 2013-03-13

基金项目: 教育部重点项目 (211056); 上海市教育委员会创新项目 (11ZZ146)

作者简介: 王燕飞 (1983—), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类发育生物学。E-mail: wangyf118@163.com

通信作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

(GenBank 登录号:BC139504.1)设计 5'RACE 下游引物 H5: 5'-TCCCGGCTCCTGCTCCGGCTCAGT GCT-3'。按照试剂盒说明使用通用引物 UPM: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG-3', RT-PCR 扩增反应均按照试剂盒操作说明进行。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,胶回收目标片段,连接 pGEM-T easy (Promega 公司)载体后,转化至感受态大肠杆菌 TOP10,阳性克隆测序,与已知的片段序列拼接得到全长 cDNA。利用 MEGA 4.0 软件的 NJ 法对相关生物已知 HCS 编码氨基酸序列进行系统进化分析。

### 1.3 探针制备与 RNA 整体原位杂交

根据 *HCS* 基因序列设计引物 HCS-F: 5'-GTGTGAGGACCTCAGTAGGTGACAG -3'; HCS-R: 5'-TTCTGTGCTGGATCTGTGAGGAGAGAG -3',克隆 139 bp 片段至 T 载体,转化后挑选阳性克隆测序验证,含 *HCS* 基因片段的质粒,分别用限制性内切酶 *Nco*I 和 *Not*I 酶切,使其完全线性化。回收的酶切片段,按地高辛标记试剂盒 (Roche 公司)说明书,分别用 Sp6 和 T7 转录酶进行体外转录,合成地高辛标记的 *HCS* 正义和反义 RNA 探针,保存在 -20 °C 备用。RNA 原位杂交程序按文献[18]进行。将甲醇保存的仔鱼经过梯度复水至 PBST (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% Tween20, pH7.4),用 100 mmol/L 的甘氨酸漂洗 30 min, PBST 洗脱两次,然后置于 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 1 mol/L NaOH 溶液中,灯光照射去色素, PBST 漂洗 2 次。经盐酸处理后用 PBST 漂洗 2 次;蛋白酶 K 消化,使抗原充分暴露,再用 4% PFA 固定。将样品放置在预杂交液 (50% 甲酰胺, 0.1% Blocking reagent, 4 × SSC, 10% 1 mmol/L DTT, 19% 1 mg/mL 的 yeast t-RNA) 中 46 °C 温浴 4 h,加入探针 (预杂交液中的探针浓度为 1 ng/μL) 后再 46 °C 杂交过夜。杂交完后用 50% 甲酰胺和 50% 5 × SSC 清洗 20 min。然后梯度至 0.2 × SSC,用 0.5 × PBST 洗两次。仔鱼在 37 °C 抗体稀释液中震荡 1 h,再用 1:2 000 ~ 1:5 000 的地高辛抗体 37 °C 震荡 4 h,然后 PBST 漂洗, TSM1 (0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L MgCl<sub>2</sub>) 漂洗, TSM2 (0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L MgCl<sub>2</sub>) 漂洗, RED FAST 显色液室温下遮光显色 (2 ~ 3 h), 放置在 0.5 ×

PBST 中过夜,然后,样品于 4% PFA 中 4 °C 保存。

### 1.4 显微观察和图像处理

用奥林巴斯 SZX7 解剖镜观察经 RNA 整体原位杂交处理的仔鱼样品,用 QImaging CCD 拍照记录。然后,把经 30% 蔗糖的 PBS 4 °C 过夜处理的仔鱼样品包埋在琼脂胶中,冰冻切片成 10 μm 的厚度,该切片在显微镜下观察和拍照,图片经 Adobe Photoshop 7.0 软件编辑。

## 2 结果

### 2.1 *HCS* 基因 cDNA 全长序列的特征

斑马鱼 *HCS* 基因的全长 cDNA 为 2 942 bp, 5'UTR 为 112 bp, 3'UTR 为 340 bp, 含有典型的 Poly(A) 加尾信号序列 AATAA, 在 3'UTR 还分别存在 (CA)<sub>10</sub> 和 (CA)<sub>15</sub> 两个微卫星序列 (图 1)。斑马鱼 *HCS* 基因的全长 cDNA 已提交公共数据库 (GenBank 登录号: KC247151)。

斑马鱼 *HCS* 开放阅读框长度为 2 490 bp (图 1), 编码 829 个氨基酸, 其分子量为 91.218 ku, 等电点为 5.931。斑马鱼 *HCS* 氨基酸序列保守性不是很高, 与墨绿凹鼻鲀 *Tetraodon nigroviridis* (GenBank 登录号: CAF98569.1) 的相似性为 46%, 与人 *Homo sapiens* (GenBank 登录号: BAA13332.1) 相似性为 43%。相似性较高的区域主要位于近 C 端的 BirA 功能结构域, 其与人 *HCS* 的 BirA 功能结构域 (477 ~ 605aa) 氨基酸序列的同源性可达到 63% (图 2), 表明斑马鱼 *HCS* 应具有催化生物素酰化的功能。各种生物 *HCS* 氨基酸序列的分子进化显示, 斑马鱼 *HCS* 与墨绿凹鼻鲀聚集在一起 (图 3)。

### 2.2 斑马鱼仔鱼 *HCS* 基因表达的空间分布

初孵仔鱼有明显的卵黄囊, *HCS* 基因表达信号在头部非常强, 覆盖整个头部, 躯干部的表达信号主要集中在肌肉、肠道等组织 (图版 - 1)。阴性对照没有信号 (图版 - 2)。进一步的切片观察显示, 在脑、眼、肠道、肌肉等组织中均有明显的信号分布 (图版 - 3, 4)。肌节中的 *HCS* 表达信号没有明显的分节现象 (图版 - 5)。

孵化后第 6 天仔鱼, 卵黄囊已消失, 鳔已形成。相比初孵仔鱼, 总体上 *HCS* 表达信号要略弱一些 (图版 - 6), 阴性对照没有信号 (图版 - 7)。在脑、脊髓、鳃、心脏、肠道、肌肉组织中仍然有明显地表达 (图版 - 8, 9)。值得注意的是, *HCS* 仍

在躯干部的肌肉组织中表达,但其仅在每一肌节的中部表达,呈现出明显地分节现象(图版-10)。

```

TACATGGTGGGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATGGTTCAACTAGTGGTTCCTGGTCATCACCATCACCAT   70
CACTCCGGGGTCTGGTGCCACGCGGTAGTACTGCAATTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCTG   140
AACGCCAGCACATGGACAGCCAGATCTGGGTACCGTGGTGGTCCGGTGATGACGACGACAAGAGTCC   210
CATGGGATATCGGGGATCCGAATCTGTACAGGCCTTGGCGCGCTGCAGGCGAGCTCCGTCGACAAGCT   280
TGCTGATCAGCTCTGTACATCTACCTGTGGATGCGCTTCAGCGGCGCTACGCCCTCCGTGATCCGCG   350
ACGCGCTGCGGGGCTGAGCGGCGACACCGCGGCTTACCTTCCGCCAGCAGAGCACCAGCAGCCCGCA   420
GAGTCCGGGGACACACTGCTGTGCAGCTCGGGGACCGGGGAGTGTTCATCACCAGCCGCGAGGTGCTG   490
AACTGGTCTGACCTGTGTCTCCCGCTGGCGTGCACTCCAGGTGAGCCGTACCGGGCCGTAGCAGAAACA   560
GCCTGGAGAACTTACGCCCTCGGCGTGGCTTTCATGGAGATCGTCTGCGCATGGAGAACGGGCTCAT   630
ACCTGCCAAGATCACCTCCGTGTCCCTCAGAGAAGCAGCGCTGCAGGAGCTGATCCAAAGTCAGCAGAG   700
AGACGCCTCAGTGCCCGCAGCAGCACCACCGAGCCACTCCGAGCACCAGCACATGGACGGACACCACC   770
TGCACTGTCCAGTGCACCGAGTGCCGGAGCTGGAGAACAGCACCATCCTGTGAGTGCAGTGCAGCTC   840
CGTGAGAAACATCCCGGACCTGCCGAGGACTGCAGCACTGAGCCGAGCAGGAGCCGGGACACAGTGT   910
GCGCATGGGAAGCCCCCAATGTGCTGGTGTATACGGACGGCTGTGAGCAGCAGTTCAGAAAGATCCGCT   980
CGCTGCTGGCGGAGTGTGTGGACACTGAGCGCTACACCGTGTACCACCTGCAGCCGACGAGCGCTGAG   1050
CGAGCCTTGGCTGGAGAACACCCCTGCTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG   1120
CTGCAGCTGCGCTTCTGTCTTACCTGAGCCAGGCGGGCGTCTGCTGGGGCTGTGCTGCTCCCTGTGCC   1190
CCGCCGGCTCACCTGCGGCCTCGGGCCCCACCGCACCCGCGAGCTCTGCAGCTGAGCTTACCCGGGC   1260
GGACAGCAGCCAGTGCAGCTCAGCGTGGTGTCCAGCGGGAGCGTGTTCGAGCGGGATGGAGGTGCCGG   1330
GGCAGGTGGAGCTGTGGGGGAGATCAGCGGGCAGGAGATGGCCATCGTCAGGGTCACACACGGGCCCG   1400
ACAGCGGAGAGGCCATTCTGTGTCAGGTGCGTCTGGACTCTGCTCCAGCTCCTCATCACCTGTGGGCAC   1470
CCAGAGCTGCTCTGAGCTGGAGACGAGCGACGCCCTGCGCTACCAGGTGCTGACGGAGATCTGACCTCT   1540
CTGGACTGAGCTGTGGCGGAGCCAGGTGCTGCCGCACACCCCATACACCTGCTGACCACACACCCGG   1610
AGCTGAAGGCCAGTTTCGTGCGCTGGCTGCGTGTGCTCAGGTGTGTGTGTCGGGGGTGTGTGCGTCTGCC   1680
GGAGTGTGTGTTGAAGGTGTGCTGGTCAAGCGCAGGAGTGTGTGGAGGTGTGTGACGGAGAGCTGGTCTTA   1750
CACACTGACCCGCCCGCGTGTCTCTGAGCTCTTACGCTGCAGACATACACACACCACCTGCAGACGC   1820
AGCGGCTCGGGCGACCGTCTTACACTGACGTACATCCTCCACCATGGACATGCTGGACGGGGTGTGAT   1890
GATGGATGCCACAGGAAGTGGGGTTAATCGCCATAGCAGCGCTCAGACACAGGCAAGGCCGCGGC   1960
GGGAACCGTGGTGTGAGTCCGCCAGGCTGCGCCATGTTACACTCCACCTGCAGCTTCTGTGAGCTCTC   2030
GCCTCGGCCAGAGATCTCTTCTGCGACACCTCAGTCCCTCGCTGTGGTGGAGGCGGTGCGCACGCT   2100
GCCCCGATATGAGGGGTGGAGCTCCAGCTGAAGTGGCCCAATGACATCTATTACAGAGACCAGGTGAAG   2170
CTGGGGGAGTCTGATCAGGTCCAGTGTGATGGGACACACCTTCAACCTGCGCATCGGCTGCGGGTCA   2240
ACGTGAGCAACAGTCAGCCGACGGTGTGTGTTAATGATGCGGTGCGCGCGCAGGGCTGCGGTCTGCCGA   2310
GCTGACCCAGAGCAGCTGATGGGCAGATGTGTCACTCTGCTGGAGCGATATATAGAGGAGTTCAGCGC   2380
TCTGGACACACACACCTGCTCACACGCTACTACACACTGGCTGCACGGGGCTCTAGCGTGGCGCTCT   2450
GGAGTGAGACGGCCCCCTCGGCGCGGGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG   2520
GGATGGAGAGGTGGTGTCACTGCAGCCCGACGGGAACCTTTTCGACATGATGAAGAACCTGTGCTGACC   2590
AAAACCAGCTGACCAGCACACACACACACACACACCTGTACTACTACATGCACCAGCACACATTCATCC   2660
AGCAGAAGCCTCCTCCAGTGTGTGTTCTGTGCTGCTGTCCAGCAGAGCACACACACACACACACACA   2730
CACACACACGGCTCTGACAGTAATGTTTGTCTGCAGGATGTGGGTAATCTGCAGTGGGTTATAGTCTGA   2800
TAAGCAGCACCAGCACAGCTGAAGCGGCTCGTGTCTCTCTCAGCGCTGGACTGACGGTGGTTCTGCTG   2870
ACACGAGTCCACTCAGGGCTGATAAATCTGTCAACTCCACATTCCTGAGCAATAAACACTGACCAC   2940
ACAAAAAATAAAAAAAAAA

```

图 1 斑马鱼 *HCS* 基因的全长 cDNA 序列

Fig. 1 Full-length cDNA sequence of *HCS* in zebrafish

翻译起始点和终止子加框表示;Poly(A)加尾信号序列 AATAA 用黑体下划线表示;两个微卫星序列用黑斜体表示。

斑马鱼 584 STMDMLDGVMMDAPQEVGLIAIAARQTQGKGRGGNAWLSPPGCAMFTLHLQLPVSSRLGQRISFL  
 人 477 TTMRLLDGLMFQTPQEMGLIVIAARQTEGKGRGGNVWLSPVGCALSTLLISIPLRSQLGQRIPFV  
 斑马鱼 649 QHLTALAVVEAVRTLPGYEGVELQLKWPNDIYYRDQVKLGGVLRSSVMGHTFNLIRIGCGFNVS 712  
 人 542 QHLMSVAVVEAVRSIPEYQDINLRVKWPNDIYYSDLMKIGGVLVNSTLMGETFYILIGCGFNVT 605

图 2 斑马鱼与人 HCS 蛋白 BirA 功能结构域序列的比较

Fig. 2 Amino acid sequences in biotin ligase domain of HCS comparison between zebrafish and human

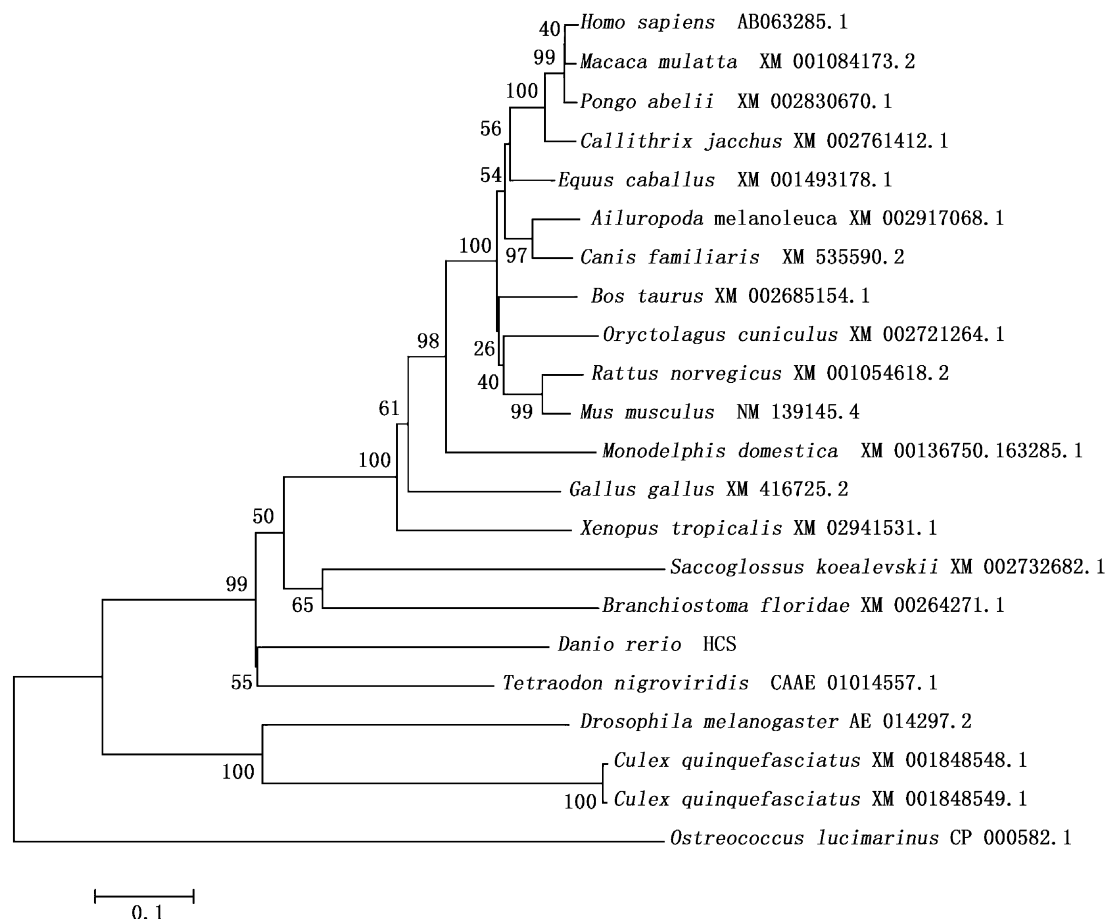


图 3 HCS 蛋白的系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic analysis of HCS proteins from various organism

### 3 讨论

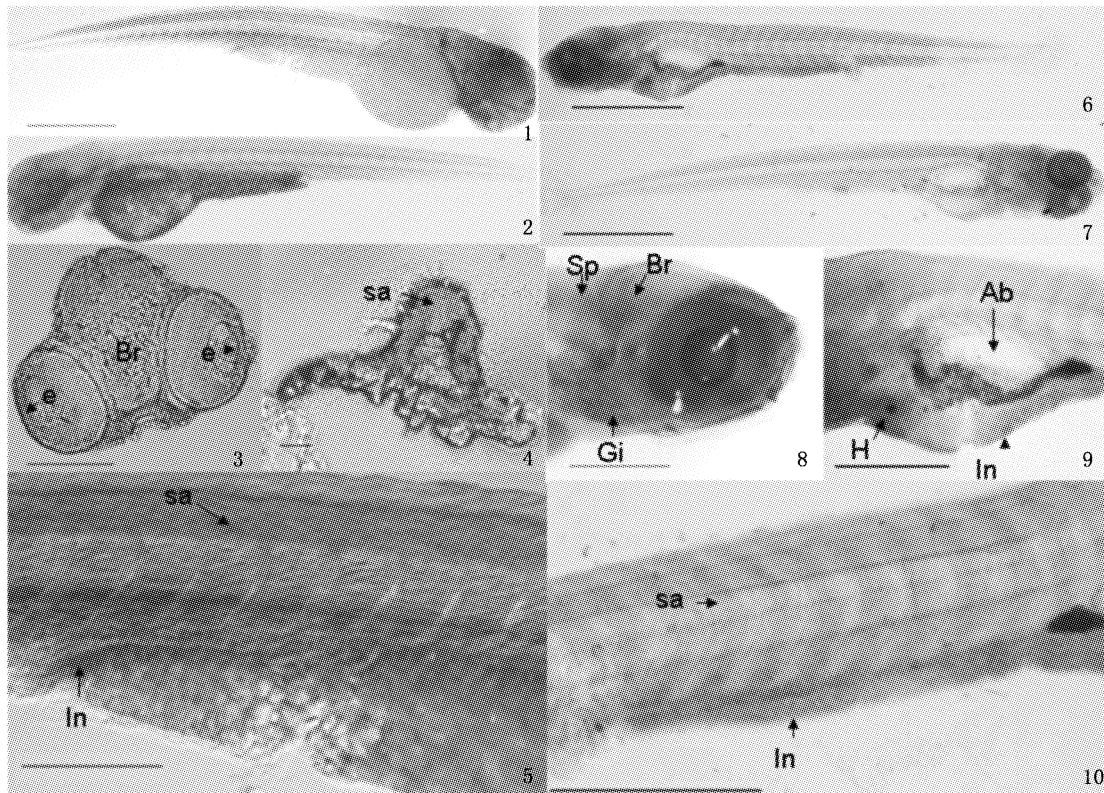
羧化全酶合成酶(HCS)是个大分子蛋白,人HCS蛋白含726个氨基酸,而鱼类HCS蛋白要比人的还要大<sup>[19]</sup>。根据本研究克隆的斑马鱼HCS基因,其编码829个氨基酸,墨绿凹鼻鲀HCS为842个氨基酸,尼罗罗非鱼为890个氨基酸。HCS蛋白发挥生物素酰化催化功能的BirA结构域位于羧基端,其氨基酸长度在鱼类和人中相接近<sup>[19]</sup>,因此,鱼类HCS蛋白应和人一样,具有催

化生物素酰化的功能,在羧化酶及组蛋白生物素酰化过程中应发挥关键作用。造成鱼类和人HCS蛋白大小差异主要在其氨基端,由于目前也不清楚人HCS蛋白氨基端功能,鱼类HCS蛋白的近氨基端序列是否具有未知的功能值得今后深入地研究。

人HCS是普遍表达的基因,在人脑、免疫器官、肌肉、内脏、生殖器官等均有不同程度的表达<sup>[20]</sup>。本研究RNA整体原位杂交检测显示,斑马鱼HCS基因在仔鱼的脑组织、鳃、眼、肌肉、心

脏、肝脏、肠道等组织中有明显表达,提示 *HCS* 基因在这些组织的生理功能或发育过程中发挥作用。鉴于人类丙酰辅酶 A 羧化酶、丙酮酸羧化酶、 $\alpha$ -甲基巴豆酰辅酶 A 羧化酶、乙酰辅酶 A 羧化酶等生物素酰化在脂肪酸合成葡萄糖异生作用、以及几种支链氨基酸和奇碳链脂肪酸的分解代谢等方面发挥作用<sup>[1-3]</sup>,具有催化生物素酰化作用的 *HCS*,其基因在斑马鱼各种组织中广泛表达,还是比较容易理解的。*HCS* 基因在初孵仔鱼肌

节表达,而随着仔鱼发育到孵化后第 6 天,其表达主要集中在肌节的中部,是否有可能与孵化后第 6 天仔鱼运动能力增强,肌节中部需要消耗更多的能量有关?此外,需要 *HCS* 催化的人类组蛋白生物素酰化在细胞增殖、DNA 损伤修复、维持基因组稳定等方面也发挥重要作用<sup>[9,21]</sup>,因此,*HCS* 在发育过程中的作用,需要今后作更为细致深入的研究。



图版 *HCS* 基因在早期仔鱼阶段的表达分布

Plate Expression pattern of *HCS* gene during early larval stage

红色为 *HCS* 基因表达信号。1. 初孵仔鱼 *HCS* 基因表达信号分布,标尺为 300  $\mu\text{m}$ ; 2. 阴性对照; 3. 经过初孵仔鱼眼睛的横切面的 *HCS* 表达信号,标尺为 100  $\mu\text{m}$ ; 4. 经过初孵仔鱼躯干部横切面的 *HCS* 表达信号,标尺为 100  $\mu\text{m}$ ; 5. 在初孵仔鱼躯干部局部区域的 *HCS* 表达信号,标尺为 100  $\mu\text{m}$ ; 6. 孵化后第 6 天仔鱼 *HCS* 基因表达信号分布,标尺为 300  $\mu\text{m}$ ; 7. 阴性对照,标尺为 300  $\mu\text{m}$ ; 8. 孵化后第 6 天仔鱼头部区域 *HCS* 基因表达信号分布,标尺为 100  $\mu\text{m}$ ; 9. 孵化后第 6 天仔鱼躯干部前部区域 *HCS* 基因表达信号分布,标尺为 100  $\mu\text{m}$ ; 10. 孵化后第 6 天仔鱼躯干部中后部区域 *HCS* 基因表达信号分布,标尺为 100  $\mu\text{m}$ ; e. 眼; Br. 脑; Sa. 肌节; In. 肠道; Sp. 脊髓; Gi. 鳃; Ab. 鳃; H. 心脏。

此外,需指出的是,斑马鱼 *HCS* 基因位于斑马鱼第 6 号染色体上 (Chr 6 92.70),但涉及到 *HCS* 基因的区域还不精确,*HCS* 基因的 cDNA 序列只有部分几个外显子能够在斑马鱼基因组确定,因此,本研究不能很好地分析 *HCS* 基因结构。即使在测序完成比较好的人类基因组,涉及到

*HCS* 基因的区域也很混乱,部分 *HCS* 基因序列在 21q22.1,而另一部分位于 21q22.13<sup>[22]</sup>。

参考文献:

- [1] LANE M D, ROMINGER K L, YOUNG D L, et al. The enzymatic synthesis of holotranscarboxylase from

- apoptocarboxylase and (+)-biotin. I. purification of the apoenzyme and synthetase; characteristics of the reaction [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1964, 239(9): 2858–2864.
- [2] SWEETMAN L, NYHAN W L. Inheritable biotin-treatable disorders and associated phenomena[J]. *Annual Review of Nutrition*, 1986, 6: 317–343.
- [3] PACHECO-ALVAREZ D, SOLÓRZANO-VARGAS R S, DEL RÍO A L. Biotin in metabolism and its relationship to human disease[J]. *Archives of Medical Research*, 2002, 33(5): 439–447.
- [4] ZEMPLIENI J. Biotin[M]//BOWMAN B A, RUSSELL R M. Present knowledge in nutrition. Washington, DC: ILSI Press, 2001.
- [5] MANTHEY K C, GRIFFIN J B, ZEMPLIENI J. Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukin-2 in Jurkat cells [J]. *Journal of Nutrition*, 2002, 132(5): 887–892.
- [6] BAEZ-SALDANA A, ESPINOZA B, ORTEGA E. Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1998, 67(3): 431–437.
- [7] WATANABE T, DAKSHINAMURTI K, PERSAUD T V N. Biotin influences palatal development of mouse embryos in organ culture[J]. *Journal of Nutrition*, 1995, 125(8): 14–21.
- [8] 朱勇文, 侯水生, 杨琳. 生物素对营养代谢调控的研究进展[J]. *饲料工业*, 2011, 32(9): 12–14.
- [9] STANLEY J S, GRIFFIN J B, ZEMPLIENI J. Biotinylation of histones in human cells; Effects of cell proliferation [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(20): 5424–5429.
- [10] PETERS D M, GRIFFIN J B, STANLEY J S, et al. Exposure to UV light causes increased biotinylation of histones in Jurkat cells[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2002, 283(3): 878–884.
- [11] KOTHAPALLI N, SARATH G, ZEMPLIENI J. Biotinylation of K12 in histone H4 decreases in response to DNA double-strand breaks in human JAr choriocarcinoma cells [J]. *Journal of Nutrition*, 2005, 135(10): 2337–2342.
- [12] ZEMPLIENI J, CHEW Y C, BAO B, et al. Repression of transposable elements by histone biotinylation[J]. *Journal of Nutrition*, 2009, 139(12): 2389–2392.
- [13] BAO B, PESTINGER V, HASSAN Y I, et al. Holocarboxylase synthetase is a chromatin protein and interacts directly with histone H3 to mediate biotinylation of K9 and K18 [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2011, 22(5): 470–475.
- [14] 王燕飞, 鲍宝龙. 组蛋白的生物素酰化[J]. *生命的化学*, 2011, 31(4): 480–483.
- [15] BAO B, RODRIGUEZ-MELENDZ R, ZEMPLIENI J. Cytosine methylation in *miR-153* gene promoters increases the expression of holocarboxylase synthetase, thereby increasing the abundance of histone H4 biotinylation marks in HEK-293 human kidney cells[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2012, 23(6): 635–639.
- [16] BAO B, RODRIGUEZ-MELENDZ R, SUBHASHINEE S K, et al. Biotin regulates the expression of holocarboxylase synthetase in the *miR-539* pathway in HEK-293 cells[J]. *Journal of Nutrition*, 2010, 140(9): 1546–1551.
- [17] STRAUSBERG R L, FEINGOLD E A, GROUSE L H, et al. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2002, 99(26): 16899–16903.
- [18] 李乐康, 鲍宝龙. 牙鲆变态发育过程中 *epigen* 基因的空间表达分布[J]. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(6): 929–934.
- [19] LEON-DEL-RIO A, LECLERC D, AKERMAN B, et al. Isolation of a cDNA encoding human holocarboxylase synthetase by functional complementation of a biotin auxotroph of *Escherichia coli* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1995, 92(10): 4626–4630.
- [20] SHMUELI O, HORN-SABAN S, CHALIFA-CASPI V, et al. GeneNote: Whole genome expression profiles in normal human tissues [J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2003, 326(10/11): 1067–1072.
- [21] CHEW Y C, WEST J T, KRATZER S J, et al. Biotinylation of histones represses transposable elements in human and mouse cells and cell lines and in *Drosophila melanogaster* [J]. *Journal of Nutrition*, 2008, 138(12): 2316–2322.
- [22] HATTORI M, FUJIYAMA A, TAYLOR T D, et al. The DNA sequence of human chromosome 21 [J]. *Nature*, 2000, 405(6784): 311–319.

## Cloning and expression of *HCS* gene in zebrafish larvae

WANG Yan-fei<sup>1</sup>, XU Yi-ping<sup>2</sup>, BAO Bao-long<sup>1</sup>

(1. *The Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 2. *Yueqing Fisheries Science Institute, Yueqing 325600, Zhejiang, China*)

**Abstract:** Some proteins or enzymes play physiologic roles depending on its biotinylation via catalyzation of holocarboxylase synthetase (*HCS*), such as histones and carboxylases. So far, our understanding of *HCS* function is mainly from the researches on human cell lines. In order to understand the role of protein biotinylation in fish development, we cloned full-length *HCS* cDNA sequence with 2 942 bp. Integrity open reading frame encodes 829 amino acids, containing conserved BirA ligase domain close to C-termino. Further investigation using whole mount RNA *in situ* hybridization shows that *HCS* gene is expressed in wide tissues such as brain, spine cord, gill, heart, intestine and sarcomere, indicating that it might play universal roles during organs development. It is interesting that *HCS* gene is expressed in whole sarcomere at new hatching larvae, whereas at 6 DAH (day after hatching) larvae, expression signal of *HCS* gene concentrated on the middle of each sarcomere. Above results may be helpful for future studies on *HCS* function during fish development.

**Key words:** holocarboxylase synthetase; zebrafish; biotinylation; RNA *in situ* hybridization