

文章编号: 1674-5566(2010)05-0577-06

牙鲆 epigen基因的克隆以及在变态过程中的表达

谢彩霞, 邢巨斌, 鲍宝龙

(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)

摘要: 为了调查表皮细胞分裂原 epigen基因是否与牙鲆变态发育有关, 分析了从变态期牙鲆仔鱼 cDNA文库中测序得到的 epigen基因。发现 epigen基因编码 162个氨基酸, 具有信号肽序列, 一个跨膜结构域和 EGF-like结构域。EGF-like结构域包含有可形成 3个二硫键的 6个半胱氨酸残基, 是表皮生长因子家族的结构特征。此外, 利用荧光实时定量 RT-PCR 调查了 epigen基因在牙鲆眼睛移动过程中的变化。相比眼睛移动之前 (17DAH, day after hatching), epigen基因在眼睛移动初期 (19DAH) 表达明显增强, 为 17DAH 时的 2.363倍; 而在眼睛移动过程的高峰期 (23DAH), 表达量明显回落, 相对 19DAH 的表达量降低了 80%; 变态结束后 (27DAH) epigen基因的表达没有重新增强或进一步的回落, 提示 epigen基因可能与眼睛移动初期的变态发育事件有关, 而与变态高峰期和变态后期的发育事件关系不明显。

关键词: 牙鲆; epigen基因; 实时定量 PCR; 表皮生长因子

中图分类号: S 917 **文献标识码:** A

Cloning and expression of epigen gene in metamorphosing flounder *Paralichthys olivaceus*

XIE Cai-xia, XING Ju-bin, BAO Bao-long

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China)

Abstract: To investigate the role of epigen, a member of epidermal growth factor, in flounder *Paralichthys olivaceus* during metamorphosis stage, we characterised the epigen gene which is cloned from the cDNA library of metamorphosing *Paralichthys olivaceus*. The epigen gene encodes 162 amino acids with a signal peptide, a transmembrane helix and a EGF-like domain. EGF-like domain contains six cysteines and three disulfide bonds and is conserved between *Paralichthys olivaceus* and other species. Fluorescent real-time qRT-PCR was used to analyse the change of epigen gene expression during metamorphosing stage. From pre-metamorphic stage (17DAH, day after hatching) to pre-metamorphic stage, the expression level of epigen gene increased by 136.3%. Then, the expression level decreased by around 80% from pre-metamorphic to metamorphic climax. There was no significant change from metamorphic climax to post-metamorphic stage and the expression of epigen gene kept at a relatively low level. The expression pattern of epigen gene during

收稿日期: 2010-02-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771668); 上海市教委重点学科建设项目 (J50701和 S30701)

作者简介: 谢彩霞 (1985-), 女, 硕士研究生, 专业方向为发育生物学。E-mail: caixia610@yahoo.com.cn

通讯作者: 鲍宝龙, E-mail: bbaob@shou.edu.cn

metamorphosing stage indicates that the epigen might be involved in the developmental events in pre-metamorphosing flounder but not at metamorphic climax or postmetamorphosis stage

Key words: *Paralichthys olivaceus*; epigen gene; real-time qPCR; epidermal growth factor

成体比目鱼(鲽形目)鱼类的外表呈现明显的左右不对称,尤其是两只眼睛位于其头部的同一侧。在早期发育的仔鱼阶段,两只眼睛位于头部两侧,呈左右对称,但至仔鱼晚期,其中一只眼睛开始向头背部移动,并最终移至头背部或头部的另一侧^[1-3]。这种外形上明显的左右不对称在脊椎动物中是独一无二的。有关资料表明:比目鱼类仔鱼眼睛移动是由于头部骨骼变形,主要是颅骨的变形、侧筛骨左右侧不等速扩大以及眼睛移动后期的眼睛移动一侧“skin thickness”的出现等推动眼睛往上移动^[4-7]。近年来,我们研究发现,眼睛移动与颅骨变形无关,而与眼睛周围皮肤组织的细胞分裂有关,是眶下皮肤组织的细胞分裂推动眼睛向上移动^[8]。

已有研究表明,甲状腺激素可调控比目鱼类眼睛移动^[9-12]。用 T_4 或 T_3 浸泡处理两眼左右对称的比目鱼仔鱼,均能促进眼睛移动^[10, 13], T_3 因为与甲状腺激素受体的高亲和力,被认为起主要作用, T_4 可能通过脱碘酶脱碘成为 T_3 , 从而起作用^[14]。但有报道指出,在眼睛移动过程中,鱼体甲状腺素 T_4 水平急剧升高,而甲状腺激素 T_3 水平变动并不明显^[11], 如 T_4 的作用是通过脱碘成为 T_3 而起作用,那仔鱼在眼睛移动过程中, T_3 的水平也应该急剧升高才是,但 T_3 的水平并没有随着 T_4 的升高而升高,表明大多数的 T_4 并不完全通过脱碘成为 T_3 。在哺乳动物,甲状腺素 T_4 参与细胞分裂的调控,是通过与其细胞表面受体整合蛋白 Integrin $\alpha V\beta 3$ 结合,激活 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 的信号通道,调控细胞分裂^[15]。在表皮细胞, epigen (epithelial mitogen) 作为一种分裂原,可激活 MAPK (MAP kinase) 调控细胞分裂^[15-16]。在比目鱼中,能否参与 T_4 / Integrin $\alpha V\beta 3$ 的信号通道,目前还不清楚。在本实验室构建的变态期牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 仔鱼的 cDNA 文库中,发现了 Epigen 基因序列。因而,本研究对牙鲆 epigen 基因序列进行了分析,并利用实时定量 PCR 技术调查了 epigen 基因在牙鲆眼睛移动前后各阶段的表达变化,以期为进一步调查 epigen 及甲状腺素 T_4 是否

对导致比目鱼眼睛移动的细胞分裂信号途径具有调控作用作前期研究。

1 材料与方法

1.1 样品来源和总 RNA 抽提

15 DAH (孵化后 15 d) 牙鲆仔鱼购自河北北戴河养殖中心,于本实验室养殖。养殖用器具都事先用高锰酸钾消毒洗净,海水盐度 35,用盐卤配制,充分曝气 3 d 后使用,水温控制在 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, 每天定时投喂至少 3 次新鲜孵化的卤虫。分别取孵化后 17 d (变态前,眼睛没有移动), 19 d (变态初,右眼开始移动), 23 d (变态高峰期,右眼移至头顶) 以及 27 d (变态后,右眼完全移至左侧) 的正常牙鲆,用作实时定量 PCR 分析。牙鲆总 RNA 抽提采用 Trizol 法^[17],用 1% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭 (EB) 染色检测 RNA 的完整性,并用分光光度计测定 RNA 浓度,结果表明提取总 RNA 的 A_{260}/A_{280} 吸光值比例在 1.8~2.0 之间。

1.2 cDNA 序列分析和蛋白质预测分析

在本实验室构建的变态前牙鲆仔鱼的 cDNA 文库中,随机测序 2 193 克隆,获得了 1 051 个单一基因序列,通过 BLAST 分析,鉴定得到牙鲆的表皮细胞分裂原 epigen 基因,该基因 cDNA 序列覆盖整个编码框。利用 NCBI 的在线软件 ORF Finder^[18],对 epigen 基因序列进行开放阅读框预测;通过 NCBI 上的 Protein Blast 比对分析牙鲆 epigen 氨基酸序列与其它物种的相似性,并用 BioEdit 软件对 GenBank 中相似性较高的各物种的 epigen 进行同源性比较。用 DNASTar 中的 Protean 软件计算该蛋白的分子量及等电点,进行亲疏水性分析及二级结构预测,用 SignalP 3.0 分析信号肽序列,用 Tmpred 进行跨膜结构分析,通过搜索 PROSITE 蛋白质数据库进行功能域分析^[18]。

2 荧光定量 PCR 分析

2.1 cDNA 单链合成

取以上各时期牙鲆的总 RNA 2 μg 以合成的

18T寡核苷酸为引物(上海生工生物有限公司),逆转录获得 cDNA 单链。具体方法参见 M MLV 反转录系统(Promega公司)说明书。

2.2 引物设计及常规 PCR 反应

根据 epigen 基因序列设计引物 epigen F: 5'-CAGCTCAACGCCAGTGTC-3'; epigen R: 5'-GCAGATGCAAGAGGGTTCG-3', 用于荧光定量 PCR。以牙鲆的 β -actin 基因(GenBank 序列号: EU090804.1)作为参照基因,设计引物 actin F: 5'-GAGGTTCCGTGTGCCGAG-3'; actin R: 5'-CAGGTCCTTACGGATGTCCAC-3'。引物均由上海生工生物有限公司合成。利用常规 PCR 方法扩增目的片段,具体反应过程如下: 95°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s 54°C 退火 30 s 72°C 延伸 20 s 循环 30 次;最后 72°C 再延伸 10 min。产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2.3 实时荧光定量 PCR

每个样品设 3 次重复。按下列组份配制 PCR 反应液: SYBR Premix Ex Taq™ (2×) 12.5 μ L PCR Forward Primer (10 μ mol/L) 0.5 μ L PCR Reverse Primer (10 μ mol/L) 0.5 μ L 模板(cDNA 溶液) 0.5 μ L 加入 ddH₂O 补足至 25 μ L。

Real-time qPCR 反应条件如下: 95°C 3 min 预变性,然后以 95°C 10 s 54°C 30 s 进行 40 个循环,再 95°C 1 min 54°C 1 min 1 个循环,最后 54°C 至 95°C 10 s。用 BioRad Q5 软件进行熔解曲线分析和 CT 值分析, epigen 表达量以参照基因(β -actin)作为标准进行相对定量,相对定量方法采取常用的比较 CT 值法^[19],用 SPSS 13.0 软件进行表达量的单因素方差分析^[20]。

3 结果与讨论

3.1 牙鲆表皮细胞分裂原 epigen 基因的分析

从变态前牙鲆仔鱼 cDNA 文库中得到的 epigen 基因的 cDNA 序列长度为 636 bp 覆盖整个读码框。该基因的读码框 489 bp 编码 162 个氨基酸(图 1)。Epigen 基因编码的蛋白分子量为 17 808.86 u 等电点为 6.44;氨基端有一个较大的疏水性区域,从 V¹²到 S²⁹之间的 18 个氨基酸为信号肽序列,从 L¹²⁰到 I¹⁴²共 23 个氨基酸为疏水性区域,是一个跨膜结构域;具有很强的抗原性,二级结构以 β 螺旋和转角为主,也存在 α 螺旋和随机卷曲。功能域分析发现,该蛋白有一个 EGF-

```

1 bp  atcagacatcacaccaacagaagacgagATGTTTCCAATAAGACAGACCAACCTGGAGAG
                                     M F P I R Q T N L E R 11 aa
61 bp  AGTCGTCCTCTCAGCGGTGGCAGTGCTGCTCCTCCTGACCACAGCAGGACAAAGTGCGAT
      V V L S A V A V L L L L T T A G Q S A I 31 aa
121 bp TCTGACCGACGACCTCCAGACAACAGCAGCTTCTCTTCTTCAAATACGACCACGCAGCT
      L T D D L Q T T A A S L L S N T T T Q L 51 aa
181 bp CAACGCCAGTGTCGTGGAGTATCCACGGGTCTGCGATCATTAGATCATGTGACAGCAA
      N A S V V E Y P R V L R S F R S C D S K 71 aa
241 bp AGATGAAAAATACTGTGGGAACGGCGGCGAGTGCATATACCCCAAGACAGTAACGAACC
      D E K Y C G N G G E C I Y P Q D S N E P 91 aa
301 bp CTCTTGATCTGCAAGTCTCATATAGCGGCGCTCGCTGCCTCTTCTTCAGCGAAATCGT
      S C I C K S S Y S G A R C L F F S E I V 111 aa
361 bp TTATACTCTGCCTGAGTTAGAGCGGCTGATCGGCATCAGCTTTGGGGTCGTCATGCTCCT
      Y T L P E L E R L I G I S F G V V M L L 131 aa
421 bp CTTGATCATGGCCATCATGATTTACTGCTTTATCAACAGGAGGTGTATGAAATCTGCACC
      L I M A I M I Y C F I N R R C M K S A P 151 aa
481 bp ACTGATAAAATCTGCACCCTCTGAAACATCAGTGTGActgttgacactccctgttctctcc
      L I K S A P S E T S V * 162 aa
541 bp tcctcctcctcatcttcatcactgctaccaccatcgtaacgctgacacacaagcactc
601 bp gagggggggcccggtacccaattcgccctatagtga

```

图 1 epigen cDNA 序列及其阅读框编码的氨基酸序列

Fig 1 The cDNA and amino acid sequences of epigen
 加下划线为起始密码子和终止密码子;阴影部分为 EGF-like 结构域。

like(表皮生长因子样)结构域,该功能域从第 S⁶⁴到 L¹⁰⁵个氨基酸(图 1),包含有 6 个半胱氨酸残基,可形成 3 个二硫键: C¹-C³、C²-C⁴和 C⁵-C⁶,同已知的其它物种的 epigen 基因一致^[16]。EGF 结构可与细胞表面受体结合,引发二聚体,从而激活受体细胞质部分的酪氨酸激酶结构域,传递细胞分裂和 DNA 合成的信号。这一特殊结构域的存在决定了 epigen 作为表皮细胞分裂原具有与细胞分裂等相关的功能。

通过 NCBI 的 Protein Blast 比对分析,发现牙鲆 epigen 氨基酸序列与花斑剑尾鱼 (*Xiphophorus maculatus* ACZ04971.1)、大西洋鲑 (*Salmo salar*

NP_001134617.1)、白斑狗鱼 (*Esox lucius* ACO14290.1)、斑马鱼 (*Danio rerio* XP_001344391.1)、原鸡 (*Gallus gallus* NP_001012404.1)、人 (*Homo sapiens* ABB60048.1)和小鼠 (*Mus musculus* NP_444317.1)的氨基酸序列相似性,分别为 47%、43%、41%、30%、34%、30%和 27%, BioEdit 软件分析表明,各物种间 epigen 差异较大,但 EGF-like 结构域区相对其他区域而言较为保守,且在相近位置都分别具有 6 个半胱氨酸残基(图 2),这 6 个半胱氨酸残基形成 3 个二硫键,可能对蛋白的二级结构和功能有重要作用。

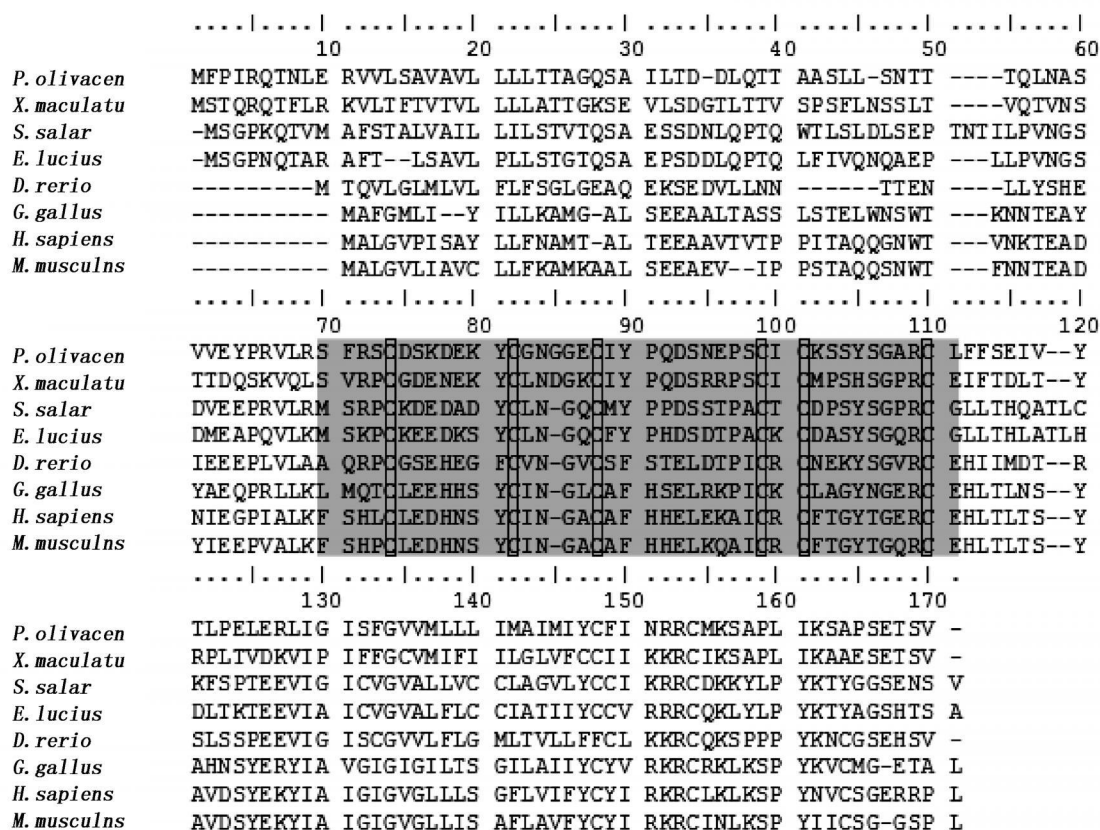


图 2 epigen 氨基酸序列的同源比较

Fig 2 Homologue comparison with epigen amino acid sequences

P. olivaceus 牙鲆; *X. maculatus* 花斑剑尾鱼; *S. salar* 大西洋鲑; *E. lucius* 白斑狗鱼; *D. rerio* 斑马鱼; *G. gallus* 原鸡; *H. sapiens* 人; *M. musculus* 小鼠; 阴影部分为 EGF-like 结构域部分,加方框的为其中的 6 个半胱氨酸。

3.2 epigen 基因在眼睛移动前后的实时定量分析

3.2.1 常规 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测

为测试用于荧光定量 PCR 的引物特异性,先

进行了常规 PCR 的检测。每对引物的扩增产物在琼脂糖凝胶电泳中只出现唯一符合预期长度的明亮条带(图 3); β -actin 和 epigen 基因片段的扩增产物大小在 121 bp 和 138 bp 标准片段附近,与预期结果一致,表明不存在明显的引物二聚体

或非特异 PCR 产物;阴性对照由于没有加入模板,琼脂糖凝胶电泳中没有出现条带,没有产生引物二聚体,所以设计的引物满足试验要求。

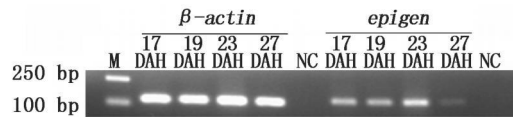


图 3 PCR 扩增产物凝胶电泳

Fig 3 Electrophoresis of PCR products

M: D₂₀₀₀ DNA Marker; NC: 阴性对照; DAH: 孵化后天数

3.2.2 *epigen*在牙鲆眼睛移动前后的表达量分析

熔解曲线分析表明, *epigen*和 β -actin 基因均为特异性扩增, 没有发现非特异性扩增和引物二聚体存在。荧光实时定量分析表明(图 4), *epigen* 基因在仔鱼眼睛移动前后都有表达, 17DAH(眼睛未开始移动)时表达量较低, 19DAH(眼睛开始移动)时表达量显著升高, 平均值为 17DAH 时的 2.363 倍, 23DAH(变态高峰期)、27DAH(眼睛移动完成后)表达量显著降低 ($P < 0.05$), 相比 17DAH, 约降低 50%, 相比 19DAH, 约降低 80%。23DAH 与 27DAH 时 *epigen* 表达量无显著性差异 ($P > 0.05$)。

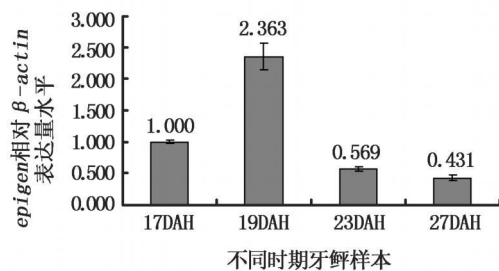


图 4 *Epigen* 相对 β -actin 基因的表达情况

Fig 4 Expression of *epigen* relative to β -actin

Epigen 基因在牙鲆仔鱼眼睛开始移动的 19DAH 表达增强, 表明其与变态有关。甲状腺素 T_4 水平在牙鲆眼睛开始移动后也开始增强^[11], 其与 *Epigen* 基因表达增强是否与调控细胞分裂有关, 值得进一步的研究。*Epigen* 基因在变态高峰期 (23DAH) 表达量就开始明显下降, 这与甲状腺素 T_4 水平的变化明显不同, T_4 在牙鲆变态高峰期, 水平进一步提高^[11]。在变态高峰期, 除了眼睛继续移动外, 还存在脑颅及脑腔逐渐变形、视轴和内耳平衡逐渐偏转, 有些组织类型从仔鱼

型向稚鱼型转变等其它变态事件^[21-25], 已表明甲状腺素 T_4 调控比目鱼整个变态事件, 而 *Epigen* 基因在牙鲆变态高峰期水平显著降低, 提示我们其与其它变态事件没有很密切的关系, 而可能只参与眼睛的起始移动。

参考文献:

- [1] 李思忠, 王惠民. 中国动物志, 硬骨鱼纲, 鲽形目 [M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [2] Nelson J S. Fishes of the World [M]. New York: John Wiley & Sons, 2006.
- [3] 张孝威, 何桂芬, 沙学坤. 牙鲆和条鲷卵子及仔、稚鱼的形式观察 [J]. 海洋与湖沼, 1965, 7(2): 159-180.
- [4] Brewster B. Eye migration and cranial development during flatfish metamorphosis: a reappraisal (Teleostei: Pleuronectiformes) [J]. J Fish Biol, 1987, 31: 805-834.
- [5] Wagemans F, Focant B, Vandewalle P. Early development of the cephalic skeleton in the turbot [J]. J Fish Biol, 1998, 52: 166-204.
- [6] Okada N, Takagi Y, Seikai T, et al. Asymmetrical development of bones and soft tissues during eye migration of metamorphosing Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Cell and Tissue Research, 2001, 304: 59-66.
- [7] Okada N, Takagi Y, Tanaka M, et al. Fine structure of soft and hard tissues involved in eye migration in metamorphosing Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Anatomical Record, 2003, 273A: 663-668.
- [8] 鲍宝龙. 解释牙鲆变态过程中右眼移动的新模型及相关基因的筛选 [D]. 上海: 复旦大学, 2006.
- [9] Inui Y, Miwa S. Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae [J]. Gen Comp Endocrinol, 1985, 60: 450-454.
- [10] Miwa S, Inui Y. Effects of various doses of thyroxine and triiodothyronine on the metamorphosis of flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Gen Comp Endocrinol, 1987, 67: 356-363.
- [11] Tagawa M, Miwa S, de Jesus et al. Changes in Thyroid Hormone Concentrations during Early Development and Metamorphosis of the Flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Zoological Science, 1990, 7: 93-96.
- [12] 张臻宇, 鲍宝龙. 鱼类早期发育阶段甲状腺激素的作用 [J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(1): 68-75.
- [13] 鲍宝龙, 张臻宇, 龚小玲, 等. 外源甲状腺素及可的松对牙鲆早期发育阶段生长、发育和变态的影响 [J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(3): 242-246.
- [14] Zhang J, Lazar M A. The mechanism of action of thyroid hormones [J]. Annu Rev Physiol, 2000, 62: 439-466.
- [15] Davis P, Leonard J, Davis F. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone [J]. Frontiers in Neuroendocrinology, 2008, 29: 211-218.

- [16] Strachan L, Murison J, Prestidge R, et al. Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the EP growth-factor superfamily [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 18265—18271.
- [17] 杨琳琳, 蒋燕, 杨桂梅, 等. 银鲳皮肤和肌肉组织的基因表达谱分析 [J]. *上海水产大学学报*, 2008, 17(4): 390—395.
- [18] Brown T A. 基因克隆和 DNA 分析 [M]. 2 版. 魏群, 译. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [19] Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402—408.
- [20] 卢纹岱. SPSS for Windows 统计分析 [M]. 3 版. 北京: 电子工业出版社, 2006: 120—131.
- [21] Graf W, Baker R. The vestibuloocular reflex of the adult flatfish I. Oculomotor organization [J]. *J Neurophysiol*, 1985a, 54: 887—899.
- [22] Graf W, Baker R. The vestibuloocular reflex of the adult flatfish II. Vestibulooculomotor connectivity [J]. *J Neurophysiol*, 1985b, 54: 900—916.
- [23] Graf W, Spencer R, Baker H, et al. Vestibuloocular reflex of the adult flatfish III. A species-specific reciprocal pattern of excitation and inhibition [J]. *J Neurophysiol*, 2001, 86: 1376—1388.
- [24] Fukuhara O, Rosenthal H, Witt U, et al. Development and behaviour of larvae and juveniles of turbot *Scophthalmus maximus* L. in hatchery tanks [J]. *International Council for the Exploration of the Sea*, 1990: 1—21.
- [25] Yamano K, Miwa S, Obinata T, et al. Thyroid hormone regulates developmental changes in muscle during flounder metamorphosis [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1991, 81(3): 464—472.