

文章编号: 1674-5566(2013)05-0641-09

牙鲆 *ras-2* 基因 cDNA 全长的克隆和变态时期的表达分析

韦芬, 何欣慰, 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: Ras 主要参与表皮生长因子家族调控细胞分裂的信号通路。采用末端快速扩增法获得了牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) *ras-2* 基因全长 2 384 bp cDNA 序列, 该序列编码 187 个氨基酸, 含有 switch I、switch II、P-loop、CAAX box 等 Ras 家族的结构特征, 与川鲈 (*Platichthys flesus*) *ras-2* 氨基酸序列相似性最高 (96.3%)。定量 RT-PCR 检测显示 *ras-2* 基因在牙鲆成体的心脏、肝脏、脾脏、肾脏、鳃、肠、肌肉、鳍条和皮肤组织均有不同程度的表达, 其中鳍条表达量最高, 肌肉的表达量最低; 在牙鲆变态前和变态初相对表达量较高, 随着变态进行, 表达水平显著降低。牙鲆变态阶段的 RNA 整体原位杂交结果显示 *ras-2* 基因主要在鳍条、眼眶周围、颌、鳃、鼻孔、侧线等部位的表皮组织中表达, 变态前在鳍褶和体侧线表达信号最强, 变态阶段 E 期的信号稍微减弱, 主要分布在支鳍骨和鳃, 变态高峰期 (F 期和 G 期) 信号主要集中在支鳍骨、鳃和颌, H 期表达信号主要集中在鳃和支鳍骨。*ras-2* 基因表达型表明其可以通过调控细胞分裂的方式, 参与牙鲆变态过程中眼睛移动、冠状幼鳍发育、侧线发育等多种器官的发育调控。

研究亮点: 首次克隆了牙鲆 *ras-2* 基因的全长 cDNA 序列, 调查了该基因在牙鲆变态阶段的表达水平及空间表达分布, 表明 *ras-2* 基因可通过调控表皮组织的细胞分裂方式参与牙鲆多种器官的变态发育。
关键词: 牙鲆; *ras-2* 基因; 变态; RNA 整体原位杂交; 荧光定量 PCR
中图分类号: Q 785; S 917
文献标志码: A

原癌基因 Ras 因最早在大鼠肉瘤病毒 (Rat sarcoma) 中发现而得名, 其编码与膜相关的小鸟苷酸——核苷酸结合蛋白 (GTPase)^[1]。当其受细胞膜表面的信号, 如生长因子、激素、神经递质等传递到细胞内效应器上, 则由与 GDP 结合时的失活形式转变为与 GTP 结合的活化形式, 并通过 Ras/MAPK、PI3K/AKT、PLC/PKC 和 GTP 酶级联效应等路径传递信号, 调节细胞的生长、增殖和分化^[2-3]。已知 Fgf-Ras-MAPK 信号通路在斑马鱼体节边界的形成中具有重要作用^[4]; 血小板衍生生长因子 (Platelet-derived growth factor, PDGF)/PDGF 受体通过 Ras/MAPK 途径调控着斑马鱼的生长发育过程^[5]; 剑尾鱼表皮生长因子 Egfra 可以诱导 Ras/MAPK、PI3K 和 STAT3 等下游因子的激活^[6]; 青鳉 Egfr 过量表达可导致黑色素瘤的形成, 而在早期黑色素瘤的 Egfr 信号传递

主要是通过 Ras/MAPK、PI3K/AKT 途径^[7]。到目前为止, 已在鲤 (*Cyprinus carpio*)、斑纹隐小鲈 (*Kryptolebias marmoratus*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、川鲈 (*Platichthys flesus*) 等鱼类中报道有关 *ras* 的基因序列^[8-9]。细胞分裂在比目鱼类 (鲽形目) 变态过程中发挥着重要作用, 如甲状腺激素状态的改变影响大西洋牙鲆消化道的细胞分裂^[10]; 比目鱼变态过程中最显著的眼睛移动, 也是移动眼眶下皮肤组织的细胞分裂推动的结果^[11]。本文以牙鲆为研究对象, 利用 RNA 整体原位杂交和实时定量 PCR 调查参与细胞分裂的 *ras-2* 基因在变态前后的表达情况, 以了解 *ras-2* 在变态过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

孵化后 13 d 的牙鲆采自青岛忠海水产有限

收稿日期: 2013-03-26 修回日期: 2013-06-03

基金项目: 国家自然科学基金 (31072201)

作者简介: 韦芬 (1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类发育生物学。E-mail: weifensky@163.com

通信作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

公司基地,运回上海海洋大学实验室继续饲养,海水盐度为 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^[12],孵化后 17、19、23、27、31 d 的牙鲆依次代表变态前(眼睛没有开始移动)、阶段 E 期(变态初,右眼刚开始移动)、阶段 F 期(从左侧可以看见右侧的眼睛,右眼上缘还没有到达头顶)、阶段 G 期(变态高峰期,右眼移到头顶,从左侧恰好看到右眼上缘)和阶段 H 期(变态即将结束,右眼正好位于头顶)^[13-15],取样后一部分牙鲆样品用液氮速冻备抽提总 RNA,另一部分经 4% PFA(多聚甲醛)固定过夜后换成甲醇保存,备作 RNA 整体原位杂交。5 尾牙鲆成鱼购自上海铜川路水产批发市场,分别取心脏、肝脏、脾脏、肾脏、鳃、肠、肌肉、鳍条和皮肤组织,液氮速冻备抽提总 RNA。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

采用 Trizol 法提取各变态阶段的牙鲆仔鱼或成鱼组织的总 RNA,具体步骤参考文献[16]。利用 M-MLV 反转录酶(Promega 公司)合成 cDNA 第一条链,利用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司)合成 RACE-

Ready-cDNA,保存于 $-20 ^\circ\text{C}$ 备用^[16]。

1.3 ras-2 基因全长的克隆

根据 GenBank 中川鲈(*P. flesus*, CAA76679. 1)、鲤(*C. carpio*, AAD10839. 1)、斑纹隐小鲷(*K. marmoratus*, ABX89902. 1)、人(*Homo sapiens*, P79800. 1) ras 氨基酸序列的保守性,选择保守序列 DGETCLLDI 和 VGNKSDLGT,并根据牙鲆密码子的偏好性设计上下游引物,分别命名为 ras-2-F1 和 ras-2-R1(表 1),以孵化后 23 d 的牙鲆 cDNA 为模板,用常规 PCR 法克隆获得长度为 226 bp 的序列,再根据此序列设计 RACE 引物(表 1),按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书分别进行 5' RACE 和 3' RACE 的扩增反应,反应程序为:94 $^\circ\text{C}$ 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 3 min,5 个循环;94 $^\circ\text{C}$ 30 s,70 $^\circ\text{C}$ 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 3 min,5 个循环;94 $^\circ\text{C}$ 30 s,68 $^\circ\text{C}$ 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 3 min,25 个循环。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析,DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen 公司)回收正确大小的 DNA 片段,连接到 pGEM-T 载体(Promega 公司),转化至大肠杆菌 Top10 感受态细胞,挑选阳性克隆鉴定并送商业公司测序。

表 1 PCR 扩增所用引物序列
Tab. 1 PCR amplification primers used in this study

引物名称	引物序列(5' - 3')	用途
<i>β-actin-F</i>	GGAAATCGTGCGTGACATTAAG	RT-qPCR
<i>β-actin-R</i>	CCTCTGGACAACGGAACCTCT	RT-qPCR
<i>ras-2-F1</i>	GACGGAGAGACCTGTCTGCTGGACATC	<i>in situ</i> hybridization
<i>ras-2-R1</i>	TGCCCAGGTCGCTCTTATTTCCCAACCA	<i>in situ</i> hybridization
<i>ras-2-F2</i>	TGCTGGACATCCTGGACACT	RT-qPCR
<i>ras-2-R2</i>	GCTGTCACTGTCCTTACCCTATT	RT-qPCR
<i>ras-2-3'</i>	AGGGCTTCCTCTCGCTGTTTGCCATCAA	3' RACE
<i>ras-2-5'</i>	GGACTTGGTGTGTGTGATGGCAAACACGC	5' RACE
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	3',5' RACE

1.4 序列分析

用 DNASTAR v7.1 软件分析 cDNA 序列并预测和翻译开放阅读框;利用 NCBI 的 BLASTP 对氨基酸序列进行同源性分析;用 Clustal W 软件进行多序列比对;利用 Conserved Domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>) 和 PHD (<http://www.predictprotein.org>) 分析其保守结构域。

1.5 RNA 整体原位杂交

利用克隆长度为 226 bp 的 *ras-2* 基因片段作

为模板制备探针,将含此片段基因的质粒分别用限制性内切酶 *Not* I 和 *Sac* II (Fermentas 公司)单酶切线性化,再用 T7 或 SP6 RNA Polymerase (Promega 公司)体外合成含地高辛标记的正义或反义 RNA 探针,反应体系如下(20 μL):线性化质粒 DNA 1 μg ,4 μL 5x Transcription buffer,2 μL DTT(100 mmol),0.5 μL Rnase inhibitor(40 U),2 μL 10 \times DIG Mix,1 μL SP6 或 T7 RNA Polymerase,RNase free 水补足 20 μL 。RNA 整体原位杂交之前,需对样品进行预处理。将甲醇保

存的仔鱼梯度复水,去色素,蛋白酶 K 消化等,然后预杂交,杂交过夜,洗脱,地高辛抗体(Roche 公司)孵育,漂洗,染色,具体步骤参考文献[14],用尼康 SMZ1500 显微镜观察和记录整体信号。用于冰冻切片的仔鱼样品先经过含 30% 蔗糖的 PBS 4 ℃ 过夜,然后将样品置于包埋液中切成 8 ~ 10 μm 的厚度,信号由尼康 SMZ1500 显微镜记录。

1.6 实时荧光定量 PCR

以 β -actin 作为内参基因(引物设计见表 1),设 3 个重复,体系为 20 μL:上下游引物各 0.5 μL (10 μmol),iQTM SYBR Green Supermix 10 μL, cDNA 1 μL, RNase free H₂O 8.5 μL 补足 20 μL。RT-qPCR 反应条件如下:95 ℃ 3 min;95 ℃ 10 s, 60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 40 个循环;65 ℃ 至 95 ℃ 5 s。用 Bio-Rad CFX-96 软件进行溶解曲线分析和 Ct 值分析,相对表达量计算采用 2^{-ΔΔCt}法,其数值用平均值 ± 标准误(mean ± SE)表示。统计分析使用 SPSS 19.0 软件,并采用“LSD”单因素方差分析法比较各变态阶段或各组织之间的基因表达量差异,当 $P < 0.05$ 时,表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 牙鲈 *ras-2* 基因全长 cDNA 序列及结构分析

牙鲈 *ras-2* 基因 cDNA 序列全长为 2 384 bp (GenBank 登录号 KC845946,图 1),由 564 bp 的开放阅读框、295 bp 5'端非翻译区和一个较长的 1 525 bp 3'端非翻译区组成。开放阅读框编码 187 个氨基酸,其中含有 56 个疏水性氨基酸和 55 个亲水性氨基酸,蛋白分子量约为 21.3 ku,等电点为 7.150。该蛋白具有小 GTPase 的结构特征(图 1): switch I (33 ~ 40 残基, DPTIEDSY)、switch II (59 ~ 77 残基, AGQEEYSAMRDQYMRTGEG)、P-loop (10 ~ 17 残基, GAGGVGKS)、CAAX box (CLIL)。P-loop(即 G1)是磷酸结合域的特征序列,此外与 GDP/GTP 直接结合相关的基序还有:G2(35 残基,T)、G3(57 ~ 60 残基,DTAG)、G4(116 ~ 119 残基,NKSD)、G5(145 ~ 147 残基,SAK)等(图 1)。序列相似性分析结果表明牙鲈 *ras-2* 氨基酸与川鲈(*P. flesus*) *ras-2*、斑纹隐小鲈(*K. marmoratus*) *N-ras*、梭鱼(*L. aurata*) *K-ras-1*、人(*H. sapiens*) *K-ras-2*、青鲈(*O. latipes*) *K-ras-1* 相似性分别为 96.3%、95.7%、83%、81.9%、

81.9%,前 80 个氨基酸完全一致,第 85 ~ 164 氨基酸为易变异区,第 165 ~ 189 氨基酸为高度变异区,同时发现在第 167 个氨基酸 *K-ras*、*ras-1* 都有缺失,而 *ras-2*、*N-ras*、*H-ras* 都没有缺失(图 2)。将克隆的全长序列进行 BLASTX,与川鲈 *Ki-ras* mRNA 序列(GenBank 登录号 Y17188.1)最相似,相似性为 87%,BLAXTP 也是与川鲈 *ras-2* 最相似,为 96.3%,故本文克隆的序列命名为 *K-ras-2*,简称为 *ras-2*。

2.2 牙鲈 *ras-2* 基因的定量表达水平

RT-qPCR 检测结果表明变态前牙鲈 *ras-2* 基因表达量较高,变态开始后(E 期)表达量仍维持较高的水平,变态高峰期(G 期)表达水平显著降低($P < 0.01$),临近变态结束(H 期),表达水平进一步显著性降低(图 3a)。*ras-2* 基因在牙鲈成体检测的各组织都有不同程度的表达,其中肌肉表达量最低,鳍条表达量最高(为肌肉的 26 倍),肝脏和鳃次之(分别约为肌肉的 14 倍和 13 倍,图 3b)。

2.3 牙鲈变态期 *ras-2* 基因的空间表达分布

RNA 整体原位杂交检测表明,牙鲈 *ras-2* 基因整体表现为在变态前表达较为广泛,体侧线、鳍褶、鳃、上下颌等部位均有表达(图版-1)。变态初期(E 期)信号略为减弱,但在鳍条、鳃、上下颌部位的信号仍然较强,肌节和眼眶周围开始出现信号(图版-2)。变态阶段 F 期信号开始变弱,基因主要在鳍条、眼眶周围、上下颌、鳃盖骨后缘、侧线等部位表达(图版-3)。变态阶段 G 期,基因表达式型与 F 期非常相似,信号在眼睛周围、鳃盖骨后缘、侧线处的信号更加清晰(图版-4)。变态即将结束的 H 期,基因表达模式没有明显变化,但信号明显减弱(图版-5)。

各个组织在整个变态发育的变化具体表现为在变态前鳍条尚未开始分化,信号分布在背腹鳍鳍褶,冠状幼鳍部位信号表达较为明显(图版-1,6);变态开始后,背腹鳍开始有鳍条出现,可看到鳍条和支鳍骨均有信号分布(图版-2,3);变态高峰期和后期,背腹鳍的信号主要集中在支鳍骨,鳍条的信号很微弱(图版-4,5,10);尾鳍随着变态的进行信号逐渐减弱(图版-1~5)。在整个变态期的鳃都有信号表达,在变态前和变态阶段 E 期信号在鳃瓣和鳃盖后缘信号分布都很强(图版-1,2,7),变态 G 期和 H 期信号主要在

```

1   ATGGGGATGAATCACAATGGAGACCGAGCAGGGGCCAGGACGGATTTAAGTGTTCATTA
61  ACTTGTGCGCACAAGTTACAATCTGACAAGTAGCGTCGGGGACGATCCACATCCCGCAGCC
121 ACAGACGTGGTCTTGACCCGGGAAACAAGTTGCGGACAGTTGGCGAAGTGTTCACCAAG
181 TGTTCCGAACAAGGAAACCGTCGCGAGGCTAACGTTATGTAGCAAGCTAATCTGATTTACCC
241 AGACGTGAAGCGTGCTAACTCTCATCTCAGACCGTGCACCGAGCCACGTGAGGC
296 ATGACCGAGTACAAGCTGGTGGTGGTGGGGGCGAGGAGCGTGGGAAGAGCGCTCTCACC
    M T E Y K L V V V G A G G V G K S A L T
356 ATCCAGCTCATCCAGAACCCTTCGTAGATGAATACGACCCCAACCATCGAGGACTCGTAC
    I Q L I Q N H F V D E Y D P T T E D S Y
416 AGAAAACAGGTGGTGTGATGACGGAGAGACCTGTCTGCTGGACATCCTGGACACTGCAGGT
    R K Q V V I D G E T C L L D I L D T A G
476 CAGGAAGAGTACAGCGCCATGAGGGATCAGTACATGAGGACAGGAGAGGGCTTCCTCTGC
Q E E Y S A M R D Q Y M R T G E G F L C
536 GTGTTTGCATCAACAACACCAAGTCTTTGAGGACGTTACCTCTACAGAGAGCAGATC
    V F A I N N T K S F E D V H L Y R E Q I
596 AATAGGGTGAAGGACAGTGACAGCGTCCCATGGTGTGGTGGGAATAAGAGCGACCTG
    N R V K D S D S V P M V L V G N K S D L
656 GGCACCCGCAATGTGGAAATGCGACAGGCGCAGGAGCTGGCACGAAGCTACGGCGTGCCG
    G T R N V E M R Q A Q E L A R S Y G V P
719 TTTGTTGAGACCTCTGCCAAAACAGACAGGGTGTGGAGGAAGCTTTCTATTACTGGTA
    F V E T S A K T R Q G V E E A F Y S L V
776 CGGGAGATTAGAAAATATAAGGAGACCAACCGCAGCAACAAGAAGAGCAAGAAGAACACT
    R E I R K Y K E T N R S N K K S K K N T
836 CAGAGACGTTGTTTGATACTATAG
    Q R R C L I L *
860 CAGACCACTCACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACAGCATC
920 CTTTCATGGCACTTGTCTTACTCCTCTGTCAATTTGGAGACTTCCAGCTCAGTCCAGTCC
980 AGACAGGGTAGCAGGCAAAATCCATTCGTAAGTCCATCACAGTTTCTACTACAGCAGT
1040 TGCTATGAGTTTTCATCCAATGAGCAGTTTGTGCTGTGAATCCAGCTGTTTGTGTTGTTT
1100 TGTTTTGATGACCAAATACTAGAACTGTAGTGTTTTGTAGCTGAAAGTTAATTTTCTTT
1160 TTGGTTACCTTTGTGAAAACCTAATTTGGGTCGTGGTAGAAAGATTTATTTCCAAGAAT
1220 CATTTTCTAATTACGTATAATCCGGCCAGTGTTCAGCTCCTGTGACTTTAGGCGGTC
1280 AAGGGTTCACGGTGGTTCGTCACCTGCAATCACAAACAGGTAATGTTTGAAT
1340 TCATCTCACCAGACTCAACACAAGTTGTAGATGAGCTGCTGCATGTTCCGTCATGAGAAA
1400 AGCGTATCCTAATGACTTGGATGCTTTTTCGCTCTGTGAAAATGTTTTGCTATGATTC
1460 CCCTTGTTGTTTTCTAAAAGTTTGTCACTTAGGGCTTGAACACAACAGCAATATATAGTT
1520 GGGTTATTTCTTTCACAAAGACCACATGTTAAAGAAAGTCTATAGCATGATTAACAAAA
1580 GCTTCAAAGTTGTGTTCCAGTCTCCATGGTACACTTTATCCATTTCCCTTTAGTTTATC
1640 AATATAGACTTAAGATTAGTGGTAGTGCCAGTTCAAATGTTCTCAGGAATATGTTTC
1700 AACACAAAATGAAGGAGAGCTGAGTCAAGTCTGACCCCTGCTTCATAACTTCTTGCCAT
1760 TAATCATTTATCATTTGAAGTGTGGTCTCTGCTTTTTCATATTTCAAAGTCGCACTGCA
1820 TTCAAAGTCCAGTTTAAATGCAGCTTTTGTGTCAGTCCCAGTGTGGTGGTGGTGGT
1880 GTAAGTCACCGTGTCCAAGCTCAGCTCTGCTTCACCACACTCCATCAGAGCATGTAGTG
1940 TGTGTGTGCGTGTGCTATGCGTCCATGTGGTGCATGAAACTACTCAAACCAAGTGAATTA
2000 ACTCAGCAGCCTCACAGTGACAGTCAATGGTATCTGATCCCCTCGATGCTGGATCAACAC
2060 CTTTCAGAAAGCAACATTTTTTATGTCAGTGTTTTCTTCTTTGATTATTACTCGCTCTT
2120 AAAATGTAATGGATTTTGAAGTTAATTTTCCAGTTAAAAACCATCTGCATAATTACA
2180 TGAAGTTCAAATGGAACAACCTTAAACAAGTGTTTAGAATTATCAAGTATAGAATTTTT
2240 CCATCAGGCCCTAGTCCAGACTCACCCTTTGACATGATGTAATCCACTGTAAAAAAA
2300 TATGTAAGTGGTCTGAACAAATCTGACAGTTATGTAATAACTCTGCTGTAAT
2360 GAACAAGTAAACGTCTGTAGCTTCTAAAAA

```

图 1 牙鲆 *ras-2* 基因全长 cDNA 序列以及推测出的氨基酸序列分析

Fig. 1 Full-length cDNA and deduced amino acid sequences of *P. olivaceus ras-2* gene

Switch I region 用箭头和阴影标出; Switch II region 用横线加阴影标出; putative GDI 位点用阴影加虚线标出; P-loop (G1) 用方框加阴影标出; G2 用小十字形标出; G3 用小圆点标出; G4 用小正方形和阴影标出; G5 用小三角形和阴影标出; CAAX 盒用双下划线和阴影表示; * 表示终止密码子。

<i>H. sapiens</i> K-ras	MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHVDEYDPT IEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG	60
<i>H. sapiens</i> N-ras	MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHVDEYDPT IEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG	60
<i>H. sapiens</i> H-ras	MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHVDEYDPT IEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG	60
<i>O. latipes</i> K-ras-1	MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHVDEYDPT IEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG	60
<i>O. latipes</i> K-ras-2	MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHVDEYDPT IEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG	60
<i>P. flesus</i> ras-1	MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHVDEYDPT IEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG	60
<i>P. flesus</i> ras-2	MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHVDEYDPT IEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG	60
<i>C. carpio</i> K-ras	MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHVDEYDPT IEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG	60
<i>D. rerio</i> N-ras	MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHVDEYDPT IEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG	60
<i>D. rerio</i> K-ras	MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHVDEYDPT IEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG	60
<i>K. marmoratus</i> N-ras	MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHVDEYDPT IEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG	60
<i>K. marmoratus</i> H-ras	MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHVDEYDPT IEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG	60
<i>I. furcatus</i> H-ras	MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHVDEYDPT IEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG	60
<i>L. aurata</i> K-ras-1	MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHVDEYDPT IEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG	60
<i>L. aurata</i> K-ras-2	MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHVDEYDPT IEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG	60
<i>P. olivaceus</i> ras-2	MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHVDEYDPT IEDSYRKQVVIDGETCLLDILDTAG	60
<i>H. sapiens</i> K-ras	QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINN TKS FED IHHYREQIKRVKDS DVP MVLVGNKCDL	120
<i>H. sapiens</i> N-ras	QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINN TKS FAD INLYREQIKRVKDS DVP MVLVGNKCDL	120
<i>H. sapiens</i> H-ras	QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINN TKS FED IHQYREQIKRVKDS DVP MVLVGNKCDL	120
<i>O. latipes</i> K-ras-1	QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINN TKS FED IHHYREQIKRVKDS DVP MVLVGNKCDL	120
<i>O. latipes</i> K-ras-2	QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINN TKS FED IHHYREQIKRVKDS DVP MVLVGNKCDL	120
<i>P. flesus</i> ras-1	QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINN TKS FED IHHYREQIKRVKDS DVP MVLVGNKCDL	120
<i>P. flesus</i> ras-2	QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINN TKS FED VHL YREQINRVKDS DVP MVLVGNKCDL	120
<i>C. carpio</i> K-ras	QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINN TKS FED IHHYREQIKRVKDS DVP MVLVGNKCDL	120
<i>D. rerio</i> N-ras	QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINN TKS FAD VHL YREQIKRVKDS DVP MVLVGNKCDL	120
<i>D. rerio</i> K-ras	QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINN TKS FED IHHYREQIKRVKDS DVP MVLVGNKCDL	120
<i>K. marmoratus</i> N-ras	QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINN TKS FED VHL YREQINRVKDS DVP MVLVGNKCDL	120
<i>K. marmoratus</i> H-ras	QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINN TKS FED IHQYREQIKRVKDS DVP MVLVGNKCDL	120
<i>I. furcatus</i> H-ras	QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINN TKS FED IHQYREQIKRVKDS DVP MVLVGNKCDL	120
<i>L. aurata</i> K-ras-1	QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINN TKS FED IHHYREQIKRVKDS DVP MVLVGNKCDL	120
<i>L. aurata</i> K-ras-2	QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINN TKS FED IHHYREQIKRVKDS DVP MVLVGNKCDL	120
<i>P. olivaceus</i> ras-2	QEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINN TKS FED VHL YREQINRVKDS DVP MVLVGNKCDL	120
<i>H. sapiens</i> K-ras	PSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGV DDA FYT LVREIRKHK- EKMSKDGK KKKK	179
<i>H. sapiens</i> N-ras	PTRTVDTKQAHELAKSYGIPFIETSAKTRQGV EDA FYT LVREIRQYRMKKLNS DDGTQG	180
<i>H. sapiens</i> H-ras	AARTVESRQAQDLARSYGIPYIETSAKTRQGV EDA FYT LVREIRQHKLRKLNPPDESGPG	180
<i>O. latipes</i> K-ras-1	PTRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGV DDA FYT LVREIRKHK- EKMSKEGK KKKK	179
<i>O. latipes</i> K-ras-2	PTRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGV EDA FYT LVREIRQYRLSKLSKEEKTPTRC	180
<i>P. flesus</i> ras-1	PSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGV DDA FYT LVREIRKHK- EKMSKEGK KKKK	179
<i>P. flesus</i> ras-2	GTRNVESRQAQELARSYGVPFVETS AKTRQGV EEA FYSLVREIRKYKELNRSNK-KSKKN	179
<i>C. carpio</i> K-ras	PSRSVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGV DDA FYT LVREIRKHK- EKMSKEGK KKKK	179
<i>D. rerio</i> N-ras	-ARTVDTKQAQELARSYGIEFVETS AKTRQGV EDA FYT LVREIRHYRMKKLNSREDRKG	179
<i>D. rerio</i> K-ras	QSHNVDSKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGV DDA FYT LVREIRKHK- EKMSKEGK KKKK	179
<i>K. marmoratus</i> N-ras	STRTVETRQAYELARSYGVPFVETS AKTRQGV EEA FYSLVREIRRYKELNRSNK-KSKKS	179
<i>K. marmoratus</i> H-ras	PARTVDTRQAQELARSYGIPYIETSAKTRQGV EDA FYT LVREIRQHKLRKLNPPDESGQD	180
<i>I. furcatus</i> H-ras	PARTVDTRQAHELARSYGIPYIETSAKTRQGV EDA FYT LVREIRQHKLRKLNPPDESGQD	180
<i>L. aurata</i> K-ras-1	PSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGV DDA FYT LVREIRKHK- EKMSKEGK KKKK	179
<i>L. aurata</i> K-ras-2	PSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGV EDA FYT LVREIRLYRLNKLKSKKEEKTPTRC	180
<i>P. olivaceus</i> ras-2	GTRNMEMRQAQELARSYGVPFVETS AKTRQGV EEA FYSLVREIRKYKELNRSNK-KSKKN	179
<i>H. sapiens</i> K-ras	KTKTKC IIM 188	
<i>H. sapiens</i> N-ras	CMGLP C VVM 189	
<i>H. sapiens</i> H-ras	CMSC C VLS 189	
<i>O. latipes</i> K-ras-1	KSKTK C ILM 188	
<i>O. latipes</i> K-ras-2	VNLKK C VVM 189	
<i>P. flesus</i> ras-1	KSKTK C SLM 188	
<i>P. flesus</i> ras-2	TQKRR C LI- 187	
<i>C. carpio</i> K-ras	KSKTK C VL- 187	
<i>D. rerio</i> N-ras	CLGVS C EVM 188	
<i>D. rerio</i> K-ras	KSKTK C CALM 188	
<i>K. marmoratus</i> N-ras	NQ-RR C TIL 187	
<i>K. marmoratus</i> H-ras	CMSC C VVS 189	
<i>I. furcatus</i> H-ras	CMSC C VVS 189	
<i>L. aurata</i> K-ras-1	KSKTK C TLM 188	
<i>L. aurata</i> K-ras-2	VKLKK C VVM 189	
<i>P. olivaceus</i> ras-2	TQ-RR C LIL 187	

图 2 基于牙鲆和其他物种的 ras 氨基酸序列的同源性分析

Fig. 2 Homology analysis based on ras amino acids of *P. olivaceus* and other species

人 *H. sapiens* K-ras (P79800.1)、N-ras (AAA60255.1)、H-ras (CAG47067.1); 青鲈 *Oryzias latipes* K-ras-1 (AAB86487.1)、K-ras-2 (NP001098213.1); 川鲈 *P. flesus* ras-1 (CAA76678.1)、ras-2 (CAA76679.1); 鲤 *C. carpio* K-ras (AAD10839.1); 斑马鱼 *D. rerio* N-ras (AAB40625.1)、K-ras (ABF46832.1); 斑纹隐小鲈 *K. marmoratus* N-ras (ABX89902.1)、H-ras (AAY82451.1); 蓝鲈 *I. furcatus* H-ras (ADO27815.1); 梭鱼 *L. aurata* K-ras-1 (ACO50970.1)、K-ras-2 (ACO50971.1); 牙鲆 *P. olivaceus* ras-2 (KC845946); 阴影部分表示完全一致的氨基酸; 方框表示第 167 个氨基酸。

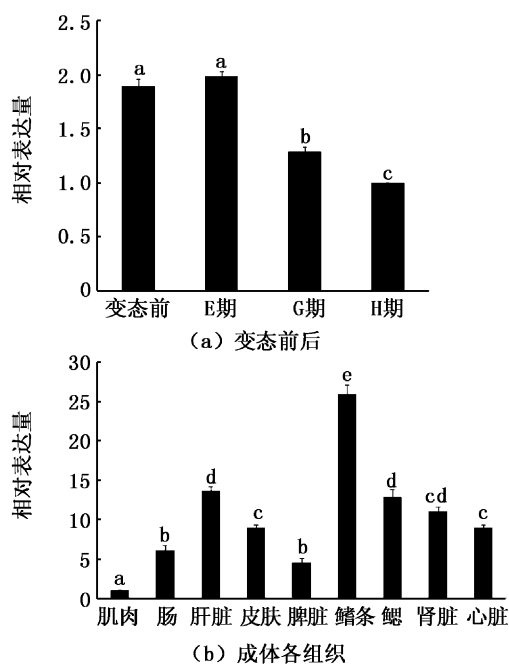


图3 *ras-2* 基因在牙鲆变态前后和成体各个组织中的相对表达量

Fig. 3 Relative gene expression of *ras-2* in different stages and adult tissues of *P. olivaceus*

标记相同小写字母表示组间没有显著性差异。

鳃盖后缘, 鳃瓣信号变弱(图版-4,5)。鼻孔和上下颌的信号在变态前和E期信号很强, 随着变态进行逐渐减弱(图版-1~5)。眼眶周围的信号从变态前开始一直持续到变态结束, 并且逐渐减弱(图版-1~5,8)。在变态前整个躯干部的体侧线都有表达, 信号相连着(图版-1); 变态开始后体侧线成点状分布(图版-3,4,9)。冰冻切片观察显示 *ras-2* 基因主要在各部位的皮肤或上皮组织中表达, 如变态前和E期的颌主要分布在表皮(图版-11,14), 变态前和G期仔鱼的眶上和眶下信号也位于皮肤组织(图版-12,16), 变态前和G期的躯干部信号也是分布在皮肤组织和支鳍骨(图版-13,17), E期鳃的分布信号主要是在鳃丝(图版-15)。

3 讨论

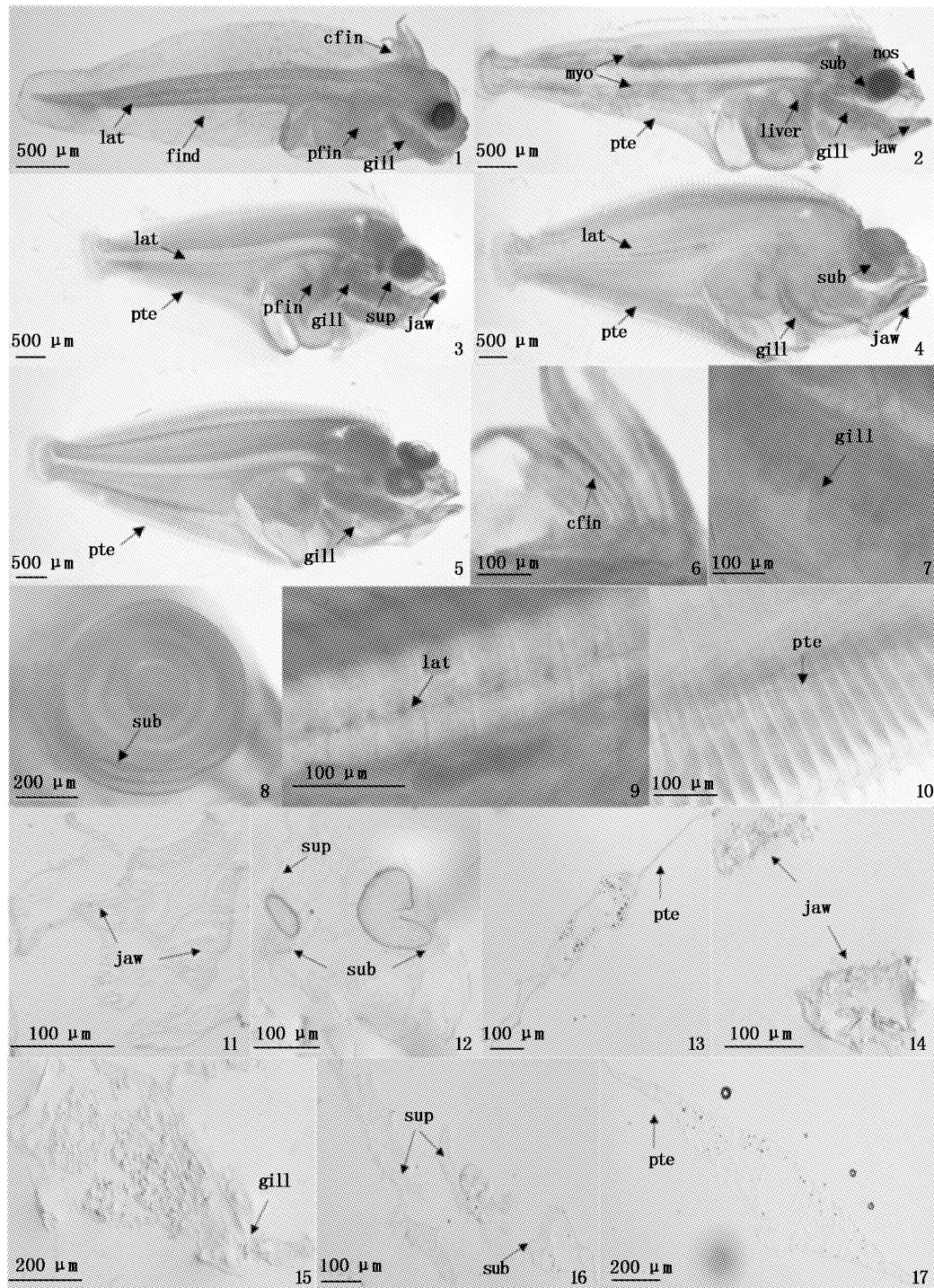
牙鲆 *ras-2* 序列有 Ras 家族典型的结构, 如 switch I、switch II、P-loop、CAAX box 等。P-loop 为 ATP/GTP-binding site motif A, 含有催化残基赖氨酸(K), 能结合核苷三磷酸的末端磷酸基团; switch I、switch II 区域组成了一个流动的界面并

能与结合的核苷酸的种类相对应^[16]。CAAX box (CLIL) 是一个脂质修饰位点, 通过异戊烯化而附着到细胞膜上^[17]。GDI 效应位点可以与 GDI (GDP 分裂的抑制剂) 结合, 阻止核苷酸交换和效应物结合, 从而延长 Ras 家族成员的失活状态^[18]。牙鲆 *ras-2* 氨基酸序列比较保守, 与其它鱼类比较有近 75% 以上的相似性, 与同属鲽形目的川鲽 *ras-2* 氨基酸的相似性高达 96.3%。

细胞分裂在发育过程中发挥重要作用, Ras/MAPK 途径主要参与表皮细胞分裂的信号传递^[11,19]。牙鲆 *ras-2* 基因在变态前和变态初期表达水平比较高, 而在变态高峰期和后期表达水平显著降低, 表明其在变态初期的细胞分裂调控过程中发挥重要的作用。空间表达分布显示, 在整个变态阶段中 *ras-2* 基因在鳃、鼻孔、上下颌、鳍条等表皮组织中均有不同程度的表达, 表明其全程参与了这些组织的变态发育。在冠状幼鳍中发现 *ras-2* 基因的表达, 这可能是首次发现与冠状幼鳍发育相关的基因, 冠状幼鳍的发生、延长和缩短与比目鱼变态起始相关^[20-21]。日本学者曾利用牛催乳素离体浸泡牙鲆冠状幼鳍, 发现能引起冠状幼鳍缩短^[22-23], 但人们对冠状幼鳍发生的调控机制仍一无所知, 今后可围绕 *ras-2* 基因开展冠状幼鳍发育的调控研究。侧线是鱼类的感觉器官, 具有感知水流、水温、测定物体方位等作用, 牙鲆在变态时从浮游生活转为底栖生活, 匍匐水底和捕食, 这需要感受器官的参与, 而 *ras-2* 基因在变态高峰期的侧线上表达明显, 表明 *ras-2* 可能参与牙鲆在变态时期侧线系统的发育调控。比目鱼在变态过程中最显著的眼睛移动是由甲状腺激素依赖的眶下皮肤细胞分裂推动的结果^[11,24], 在牙鲆眼睛移动之初, 即在右眼(移动眼)下方的皮肤组织中检测到 *ras-2* 基因的表达, 并在眼睛移动后的整个变态过程中其一直在移动眼眶下皮肤中表达, 提示我们 Ras/MAPK 途径可能参与了甲状腺激素调控细胞分裂的信号通路, 今后应进一步进行功能验证。

总之, 鉴于牙鲆变态过程中 *ras-2* 基因在各器官或部位的皮肤组织中表达, 提示我们胞内分子 Ras 主要接受表皮生长因子类信号, 参与调控牙鲆变态过程中鳍褶(鳍条)、鳃、上下颌、侧线、眼眶周围、鳃盖骨后缘等表皮组织的细胞分裂调控, 今后可加强表皮生长因子, 如表皮生长激素

及其受体、成纤维细胞生长因子及其受体、催乳素及其受体等参与牙鲈变态调控的研究。



图版 牙鲈变态前后 *ras-2* 基因信号分布

Plate Expressional pattern of *ras-2* gene during metamorphosis of *P. olivaceus*

1,6,11,12,13. 变态前; 2,7,14,15. 变态 E 期; 3,8. 变态 F 期; 4,9,16,17. 变态 G 期; 5,10. 变态 H 期; 1,2,3,4,5. 全身右面观; 6. 冠状幼鳍的放大观; 7. 鳃的放大观; 8. 眼睛的放大观; 9. 侧线的放大观; 10. 腹鳍的放大观; 11,14. 颌的横切; 12,16. 眼睛的横切; 13,17. 躯干部的横切; 15. 鳃的横切; gill. 鳃; lat. 侧线; cfin. 冠状幼鳍; find. 鳍褶; pfin. 胸鳍; pte. 支鳍骨; nos. 鼻孔; jaw. 颌; sub. 眶下组织; sup. 眶上组织; liver. 肝; myo. 肌节; 红色为 *ras-2* 信号。

参考文献:

- [1] ELLIS R W, DEBORAH D, SHIH T Y, et al. The p21 *src* genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes[J]. *Nature*, 1981, 292: 506 - 511.
- [2] JELINEK T, DENT P, STURGILL T W, et al. Ras-induced activation of Raf-1 is dependent on tyrosine phosphorylation [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1996, 16(3): 1027 - 1034.
- [3] DER C J, DYKE T V. Stopping ras in its tracks [J]. *Cell*, 2007, 129(5): 855 - 857.
- [4] SAWADA A, SHINYA M, JIANG Y J, et al. Fgf/MAPK signalling is a crucial positional cue in somite boundary formation [J]. *Development*, 2001, 128 (23): 4873 - 4880.
- [5] HOCH R V, SORIANO P. Roles of PDGF in animal development [J]. *Development*, 2003, 130(20): 4769 - 4784.
- [6] GOMEZ A, VOLFF J N, HORNUNG U, et al. Identification of a second *egfr* gene in *Xiphophorus* uncovers an expansion of the epidermal growth factor receptor family in fish [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2004, 21(2): 266 - 275.
- [7] SCHARTL M, WILDE B, LAISNEY J A, et al. A mutated EGFR is sufficient to induce malignant melanoma with genetic background-dependent histopathologies [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2010, 130(1): 249 - 258.
- [8] NEMOTO N, KODAMA K, TAZAWA A, et al. Extensive sequence homology of the goldfish ras gene to mammalian ras genes [J]. *Differentiation*, 1986, 32(1): 17 - 23.
- [9] ROTCHELL J M, LEE J S, CHIPMAN J K, et al. Structure, expression and activation of fish ras genes [J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, 55(1/2): 1 - 21.
- [10] SOFFIENTINO B, SPECKER J L. Metamorphosis of summer flounder, *Paralichthys dentatus*: cell proliferation and differentiation of the gastric mucosa and developmental effects of altered thyroidal status [J]. *Journal of Experimental Zool*, 2001, 290(1): 31 - 40.
- [11] BAO B, KE Z, XING J, et al. Proliferating cells in suborbital tissue drive eye migration in flatfish [J]. *Developmental Biology*, 2011, 351(1): 200 - 207.
- [12] 谢彩霞, 邢巨斌, 鲍宝龙. 牙鲆 *epigen* 基因的克隆以及在变态过程中的表达 [J]. *上海海洋大学学报*, 2010, 19(5): 577 - 582.
- [13] 张孝威, 何桂芬, 沙学绅. 牙鲆和条鳎卵子及仔、稚鱼的形态观察 [J]. *海洋与湖沼*, 1965, 7(2): 159 - 180.
- [14] 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.
- [15] 杨琳琳, 蒋燕, 杨桂梅, 等. 银鲱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.
- [16] VETTER I R, WITTINGHOFFER A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions [J]. *Science*, 2001, 294 (5545): 1299 - 1304.
- [17] MOORES S L, SCHABER M D, MOSSER S D, et al. Sequence dependence of protein isoprenylation [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266 (22): 14603 - 14610.
- [18] PADUCH M, JELEN F, OTLEWSKI J. Structure of small G proteins and their regulators [J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2001, 48(4): 829 - 850.
- [19] INUI Y, YAMANO K, MIWA S. The role of thyroid hormone in tissue development in metamorphosing flounder [J]. *Aquaculture*, 1995, 135(1/3): 87 - 98.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] DEJESUS E G, HIRANO T, INUI Y. The antimetamorphic effect of prolactin in the Japanese flounder [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1994, 93 (1): 44 - 50.
- [23] DEJESUS E G, HIRANO T, INUI Y. Flounder metamorphosis: its regulation by various hormones [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1993, 11(1/6): 323 - 328.
- [24] 鲍宝龙. 比目鱼类的眼睛移位和不对称的进化起源 [J]. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(5): 728 - 736.

Full-length cDNA cloning and tissues expression analysis of *ras-2* gene from *Paralichthys olivaceus*

WEI Fen, HE Xin-wei, BAO Bao-long

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

Abstract: Ras is mainly involved in the epidermal growth factor family regulating the signaling pathway of cell proliferation. To investigate the relationship between *ras-2* expression and metamorphosis in *Paralichthys olivaceus*, the full-length cDNA of *ras-2* gene with 2 384 bp was obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE). The *ras-2* gene encodes 187 amino acids with typical structure such as switch I, switch II, P-loop and CAAX box, sharing 96.3% sequence similarity with another flatfish *Platichthys flesus*. RT-qPCR revealed that *ras-2* gene was expressed universally in adult *P. olivaceus*. The highest expression of *ras-2* was found in the fin, while the lowest expression in the muscle. During metamorphosis of *P. olivaceus*, expressional level of *ras-2* gene was decreasing significantly. The whole mount RNA *in situ* hybridization further showed the expression pattern of *ras-2* during metamorphosis of *P. olivaceus* and revealed its expression mainly in the epidermal tissues located in fin, jaw, orbit, nostril, lateral line and so on. Higher expression signals were observed mainly in fin, lateral line, jaw and gill during metamorphosis. Since Ras-MAPK pathway is well-known in regulating cell proliferation, based on expressional pattern of *ras-2* gene, we postulate that *ras-2* might participate in eye migration and development of lateral line, dorsal fin and gill via regulating epidermic cell proliferation during metamorphosis of *P. olivaceus*.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *ras-2*; metamorphosis; whole-mount RNA *in situ* hybridization; RT-qPCR