

鲫鱼 Rag 基因的克隆及表达分析

范嗣刚^{1,2} 张琼宇^{1,2} 罗琛²

(1. 湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410006; 2. 浙江大学生命科学院, 杭州 310058)

摘要: DNA 重组激活基因 (Recombination activating genes RAG) 是脊椎动物特异性免疫反应的关键基因, 也是脊椎动物进化分析的标记基因之一。鲫鱼具有很强的适应性和抗病能力, 是我国广泛养殖的重要经济淡水鱼; 由于具有不同的倍性和丰富的遗传多样性, 又是研究鱼类基因组进化的独特材料。本研究用 PCR 方法扩增、克隆了鲫鱼的 *Rag* 基因。鲫鱼 *Rag1* 基因从起始密码到终止密码总长 4188bp, 由三个外显子和两个内含子组成, 其中开放阅读框长 3192bp, 编码 1063 个氨基酸。*Rag2* 基因从起始密码到终止密码总长 1593bp, 没有内含子, 只有单一的编码区, 编码 530 个氨基酸。*Rag1* 和 *Rag2* 基因的 ORF 和氨基酸序列在不同鱼类中的对比结果表明其在进化过程中非常保守。不同鱼类 *Rag1* 基因的第二内含子也是高度保守的, 转录因子结合位点分析表明在第二内含子的保守区域中有许多转录因子的可能结合位点。其中有一段在所有已知鱼类中都存在的保守区域是与性腺发育相关的转录因子 SRY 和 SOX5 的可能结合位点, 提示 *Rag1* 基因的表达可能与性腺发育具有相关性。用 RT-PCR 方法进行的组织特异性表达分析表明 *Rag1* 基因在鲫鱼成体的头肾和精巢都能检测到表达, 提示 *Rag* 基因不仅主导了免疫组织中的 DNA 重组, 也可能参与了生殖细胞的 DNA 重组。RT-PCR 检测证明 *Rag1* 基因在鲫鱼胚胎发育至第 5 天开始表达, 在第 7 天鲫鱼胚胎的胸腺原基中可检测到 *Rag1* 基因 mRNA 的杂交信号, 在第 9 天鲫鱼胚胎的胸腺原基中可以检测到很强的 *Rag1* mRNA 原位杂交信号, 说明该时期可能是鲫鱼免疫基因重组的活跃时期。

关键词: 重组激活基因; 克隆; 表达分析; 鲫鱼

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)03-0603-10

20 世纪 80 年代末, Schatz, *et al.*^[1] 在小鼠中发现了与 DNA 重组相关的重组激活基因 (Recombination activating genes RAG)。*Rag* 基因由 *Rag1* 基因和 *Rag2* 基因组成, 其编码的蛋白可激活三个编码 B、T 淋巴细胞抗原识别受体胞膜外可变区的胚系基因在 B、T 细胞发生过程中的重排。在成熟 B 细胞中, *Rag* 基因可通过对 V、D、J 基因片段的第 2 次重组再次改变抗体基因, 从而产生新的特异性抗原受体。因此, *Rag* 基因所主导的免疫基因的重组是 Ig 和 TCR 库多样性的产生的主要原因, 在特异性免疫反应中发挥重要作用^[1-4]。*Rag* 基因在大多数情况下一起表达。但在少数情况下, 比如在哺乳动物的中枢神经系统中和鸡的法氏囊中^[5,6], *Rag* 基因只有其中一个表达。*Rag* 基因在脊椎动物中普遍存在, 在进化过程中非常保守, 而且分子大小适中, 因此又被用作脊椎动物进化分析的标记基因^[7-9]。

鲫鱼属于鲤科 (Cyprinidae), 鲤亚科 (Cyprininae) 鲫属 (*Carassius*), 广泛分布于欧亚大陆。鲫鱼在低氧、碱性较强, 以及结冰期很长的水体中都能生存和繁殖, 在一般鱼类不能生存的严重污染区也依然能存活, 说明它的适应能力和抗病能力都很强。在我国, 鲫鱼是广泛养殖的食用和观赏鱼类, 具有重要的经济价值。另外, 鲫鱼具有丰富的遗传多样性, 存在多种不同倍性的亚种, 如四倍体 (*Carassius auratus auratus*)、八倍体 (*Carassius auratus langsdorfi*) 等, 被称为多倍体鱼类。因此, 鲫鱼又是研究鱼类基因组进化的独特材料。

研究鲫鱼的 *Rag* 基因可为揭示鲫鱼免疫系统的独特性及抗病能力和适应能力比一般鱼类强的原因提供重要的线索。目前虹鳟鱼、斑马鱼、爪蟾等水生脊椎动物的 *Rag* 基因已经被克隆^[10-13], 但尚未有关于鲫鱼 *Rag* 基因全长及基因结构和表达时空

收稿日期: 2007-10-29; 修订日期: 2008-11-01

基金项目: 国家“973”项目 (2004CB117401) 资助

作者简介: 范嗣刚 (1982—), 男, 湖南吉首人; 硕士研究生; 研究方向为发育的基因表达调控。E-mail: calvin1845@yahoo.com.cn

通讯作者: 罗琛, E-mail: luoc@zju.edu.cn

分析的报道。为此,我们克隆了鲫鱼的 *Rag* 基因,并用 RT-PCR 方法和整胚原位杂交方法进行了初步的时空表达模式分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料 本试验所选的鲫鱼 (*Carassius auratus*)品系为本实验室饲养的正常两性生殖的二倍体“红帽子金鱼”近交系。试验所用的鲫鱼胚胎在 (22±1)℃的水温条件下进行发育。剪取一定量的尾鳍,在 PBS 溶液中漂洗几次后,装入 EP 管中,放进液氮中迅速冷冻 5—10min,放入 -80℃冰箱中保存备用。

1.2 主要试剂 AMV、RNase inhibitor、*Taq* 酶、dNTPs、DNA Marker 和 pMD18-T 克隆载体试剂盒购

自 TaKaRa 公司;胶回收试剂盒和 E. Z. N. A.™ Tissue RNA Kit 购自 OMEGA 公司;DIG RNA Labeling Mix 购自 Roche 公司;PCR 引物合成和核苷酸序列的测序均由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.3 实验方法

1.3.1 *Rag* 基因组 DNA 序列的扩增 用已灭菌剪刀在低温下剪碎鲫鱼尾鳍。用苯酚氯仿法提取基因组 DNA。根据已有的斑马鱼 (U71093、U71094、AL935203)、鲤鱼 (AY787040、AY787041)、草鱼 (EF178284、EF514220) *Rag* 基因的碱基序列设计鲫鱼 *Rag* 基因的克隆引物。其中鲫鱼 *Rag1* 基因每对引物的 PCR 扩增产物所覆盖的范围 (图 1)。

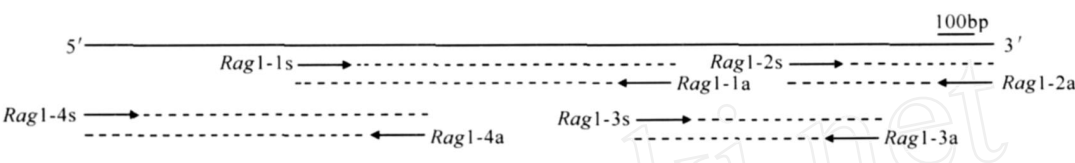


图 1 鲫鱼 *Rag1* 基因的克隆引物的 PCR 扩增范围

Fig. 1 Span of PCR product by primers used for cloning of *Carassius auratus Rag1*

用 4 对引物 (表 1) *Rag1*-1s、*Rag1*-1a、*Rag1*-2s、*Rag1*-2a、*Rag1*-3s、*Rag1*-3a 和 *Rag1*-4s、*Rag1*-4a 以鲫鱼基因组 DNA 为模板,分别进行 PCR 扩增、克隆和测序。四段序列的测序结果在 NCB I 网站上进行比对,证实为 *Rag1* 基因,然后进行拼接,得到鲫鱼 *Rag1* 基因组序列。再根据斑马鱼 *Rag1* 基因的结构以及所得鲫鱼 *Rag1* 基因的核苷酸序列,设计跨鲫鱼 *Rag1* 基因内含子的引物:跨第 1 内含子引物为 *Rag1*-5s (5'-GGAGAAAGGAGGTGGAGTT-3') 和 *Rag1*-5a (5'-GGAAAGCAGAGGTGCGAGT-3');跨第 2 内含子引物为 *Rag1*-1's (5'-GACTGGGTCCGT-TAGACTCC-3') 和 *Rag1*-1a。

表 1 用于鲫鱼 *Rag1* 基因克隆的引物

Tab. 1 Primers and their sequences used for cloning of *Carassius auratus Rag1*

引物编号	Primer	引物序列 (5'→3') Sequence of primer
<i>Rag1</i> -1s		AGGAAGCGGGCTAAACCAC
<i>Rag1</i> -1a		TCTCGCTGACA TCTCCCA TAC
<i>Rag1</i> -2s		GCCAGTGAAGGCAATGAGT
<i>Rag1</i> -2a		CCCTGTGGGACCA GTAA G
<i>Rag1</i> -3s		GGTATGGGAGATGTACGCGAG
<i>Rag1</i> -3a		GGAA GTGTAGAGCCAGTGGTGT
<i>Rag1</i> -4s		TATGGTATAA TGCTGTACGCAAGGGTC
<i>Rag1</i> -4a		GGTGGGATGGA TTTAGATGTTGGT

Note: s, Sense primer; a, Anti-sense primer

用 1 对引物 *r2*-1s (5'-TCTCGCACTGAATGCT-GGGTA-3') 和 *r2*-1a (5'-TCAGTCAAAAA GTCTCTG-CAGAAAGC-3') 以鲫鱼基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增、克隆和测序。测序结果在 NCB I 网站上进行比对,证实为 *Rag2* 基因。

1.3.2 *Rag1* 基因内含子数目和剪接位点的确定以及组织表达的 RT-PCR 分析 用 E. Z. N. A.™ Tissue RNA Kit 分别提取鲫鱼成体器官 鳃、心、肝、肠、头肾、肌肉、脾、精巢、脑和胆囊的 RNA 和受精后 3—7d 的鲫鱼胚胎的 RNA。并用琼脂糖凝胶电泳和分光光度计的方法分别检测所提取 RNA 的浓度和纯度。在无 RNA 酶的 200 μL PCR 管中加入 1 μg 总 RNA 和 50 pmol Oligd (T),于 70℃变性 5min 后,快速放置冰上冷却,再加入 5×Reverse Transcriptase Buffer 4 μL、20U RNase Inhibitor、3.5U AMV RTase、10mmol/L dNTP Mixture 1.5 μL、加入无 RNA 酶水使反应总体积为 20 μL,混合均匀,42℃反应 60min,完成 cDNA 第一链的合成。

用引物 *Rag1*-5s、*Rag1*-5a 和 *Rag1*-1's、*Rag1*-1a 以鲫鱼头肾的 cDNA 为模板分别进行 PCR 扩增,克隆和测序。将所得碱基序列和本实验得到的鲫鱼 *Rag1* 基因组序列用 jellyfish 软件分别进行分析,以分辨出鲫鱼 *Rag1* 基因的 mRNA 剪接位点,确定鲫

鱼 *Rag1* 基因的内含子和外显子。

用引物 *Rag1*-1' 和 *Rag1*-1a 以上面所得到的 cDNA 为模板分别进行 PCR 扩增, PCR 反应循环参数为: 95℃预变性 5min; 94℃变性 30s, 55℃退火 30s, 72℃延伸 1min, 30 个循环; 72℃(终末延伸 7min。同时用鲫鱼 β -actin 基因引物 actinF (5' TCACACCT-TCTACAACGAGCTGCG 3') 和 actinR (5' GAAGCTG-TAGCTCTCTCGGTCA 3') 以同样的 cDNA 为模板分别进行 PCR 扩增。其 PCR 产物长 300bp 左右, 以作为 *Rag1* 基因表达的 RT-PCR 分析的阳性对照。

1.3.3 *Rag1* 基因表达的原位杂交分析 用跨 *Rag1* 基因第 2 内含子的引物 *Rag1*-1' 和 *Rag1*-1a 以鲫鱼头肾 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。按照 Roche 公司 DIG RNA Labeling Mix 说明书制备原位杂交的探针。鲫鱼第 7 天、第 9 天胚胎原位杂交步骤按照文献 [14] 进行, 并做了适当的修改。

2 结 果

2.1 鲫鱼 *Rag* 基因的结构及其预测的蛋白结构

本实验克隆的鲫鱼 *Rag1* 和 *Rag2* 基因的碱基序列均已提交到 GenBank, 登陆号分别为 EF186007 和 EU159586。 *Rag1* 基因从起始密码 ATG 到终止密码 TGA 的基因组序列总长 4188bp。两对跨内含子引物 *Rag1*-5s, *Rag1*-5a 和 *Rag1*-1', *Rag1*-1a 进行 RT-PCR 扩增的产物电泳结果 (图 2)。引物 *Rag1*-5s 和 *Rag1*-5a 扩增产物片段的大小比预期的基因组序列大约短 100 个碱基; 引物 *Rag1*-1' 和 *Rag1*-1a 扩增产物片段的大小比预期的大约短 800 个碱基。对这些产物进行测序分析后确定第一内含子位置位于“-AACT-TCTCAGgt-”和“-agATGCCCTGTGTC-”之间; 第二内含子位置位于“-TATGATGCAAGgt-”和“-agGCAGGG-GATTT-”之间, 其剪接位点符合“GT-AG 法则”。

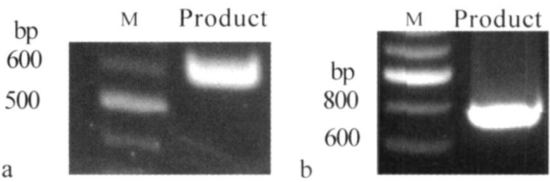


图 2 两对跨内含子引物的 RT-PCR 电泳图谱

Fig. 2 The products of PCR with primers which span the introns of *Rag1* gene

a. 引物 *Rag1*-5s 和 *Rag1*-5a 的扩增产物; b. 引物 *Rag1*-1' 和 *Rag1*-1a 的扩增产物

a: The product of PCR with *Rag1*-5s and *Rag1*-5a; b: The product of PCR with *Rag1*-1' and *Rag1*-1a; M: Marker

这些结果说明 *Rag1* 基因结构由三个外显子和两个内含子组成 (图 3a)。三个外显子分别长 308bp、1136bp 和 1748bp。第一、第二内含子分别长 105bp 和 891bp。 *Rag1* 基因开放阅读框总长 3192bp, 编码 1063 个氨基酸。 *Rag2* 基因从起始密码 ATG 到终止密码 TGA 的基因组序列总长 1593bp, 和斑马鱼 *Rag2* 基因 cDNA 序列一样长。两者通过 jellyfish 软件比对有 93.0% 的同源性, 仅仅是零星的少许碱基存在差异。因此可以确定鲫鱼 *Rag2* 基因没有内含子, 只有单一的编码区, 编码 530 个氨基酸。

根据鲫鱼 RAG 蛋白的氨基酸序列和小鼠 RAG 蛋白的氨基酸序列的同源性, 以及小鼠的蛋白质结构 [15, 16] 所推测出的鲫鱼 RAG 蛋白的结构与小鼠 RAG 蛋白的结构基本相同。鲫鱼 RAG1 蛋白也是由 N 端结构域 (1—408 aa) 和核心结构域 (408—1035 aa) 组成 (图 3b), 在 N 端结构域中有环指和锌指结构 (277—408 aa)。鲫鱼 RAG 2 蛋白只有一个核心区域 (1—380 aa) (图 3c)。

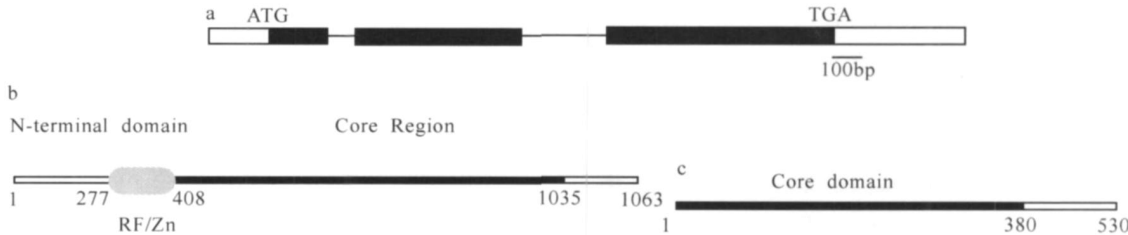


图 3 鲫鱼 *Rag1* 基因结构及推测的 RAG 蛋白结构示意图

Fig. 3 The structure of *Rag1* genomic and the putative structure of RAG protein in *Carassius auratus*

a. *Rag1* 基因, 其中白色框示非翻译区, 黑色框示外显子, 直线示内含子; b. 推测的 RAG1 蛋白结构; c. 推测的 RAG2 蛋白结构

a. Structure of *Rag1* gene, White boxes, black boxes and lines indicate untranslated regions, exons and introns, respectively; b. Putative structure of RAG1 protein; c. Putative structure of RAG2 protein

2.2 不同鱼类 Rag基因编码区碱基序列及其氨基酸序列比较及类聚分析

用 jellyfish软件对几种不同鱼类的 Rag基因的碱基序列进行分析。鲫鱼 Rag1基因编码区与斑马鱼 (U71093)、草鱼 (EF178284)、鲤鱼 (AY787040)、虹鳟鱼 (U15663)的 Rag1编码区的同源性分别为 88.8%、92.4%、94.3%、70.8%。鲫鱼 Rag2基因编码区与斑马鱼 (U71094)、草鱼

(EF514220)、鲤鱼 (AY787041)、虹鳟鱼 (U31670) Rag2编码区的同源性分别为 93.0%、90.1%、92.2%、70.2%。根据这几种鱼类 Rag1和 Rag2的 ORF序列,用 DNA star软件中 MegAlign程序的 Jotun Hein方式分别构建系统进化树 (图 4)。在根据 Rag1ORF建立的进化树中,鲫鱼先跟鲤鱼类聚;而在根据 Rag2 ORF建立的进化树中,鲫鱼先跟斑马鱼类聚。

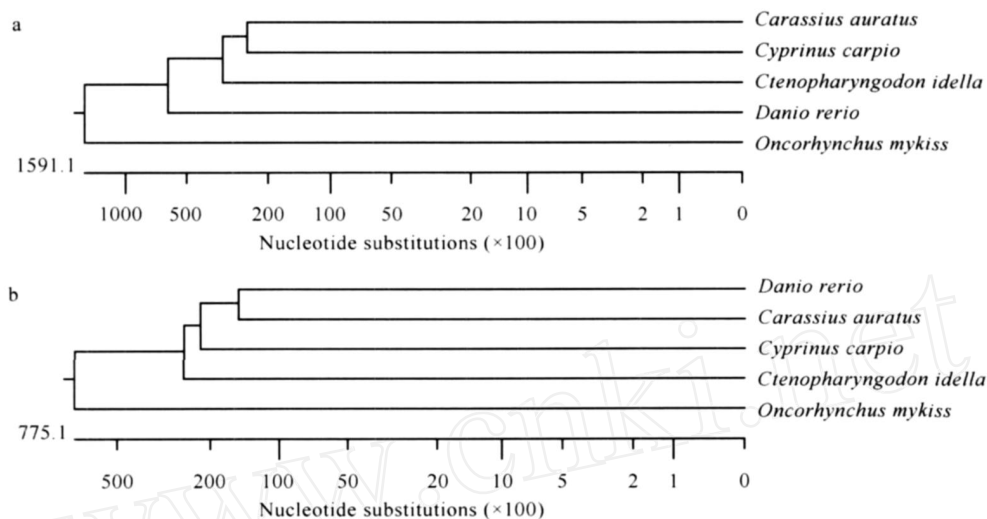


图 4 根据鲫鱼、斑马鱼、草鱼、鲤鱼、虹鳟鱼 Rag1基因 ORF(a)和 Rag2基因 ORF(b)所建立的系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of Rag1 (a) and Rag2 (b) based on open reading frame from *Carassius auratus*, *Danio rerio*, *Ctenopharyngodon idella*, *Cyprinus carpio* and *Oncorhynchus mykiss*

用 jellyfish软件分析推导的鲫鱼 RAG1氨基酸序列与斑马鱼、草鱼、鲤鱼、虹鳟鱼的 RAG1氨基酸序列的同源性分别为 91.9%、93.6%、94.9%、75.1% (图 5);推导的 RAG2氨基酸序列分别有 93.9%、90.0%、93.5%、72.2%的同源性 (图 6)。

2.3 不同鱼类 Rag基因结构的比较

鲫鱼 Rag1基因和草鱼、斑马鱼 Rag1基因一样,都有两个内含子,而虹鳟鱼的 Rag1基因只有一个内含子。鲫鱼 Rag1基因的 3个外显子和草鱼的 3个外显子都一样长,仅第二个外显子比斑马鱼的长 18bp。由于鲫鱼 Rag1基因的第一内含子在虹鳟鱼中缺失,其第一和第二外显子相当于虹鳟鱼的第一外显子,但其第一和第二外显子的总长比虹鳟鱼的短 21bp,第三外显子也比虹鳟鱼的第二外显子短 9bp (表 2)。

表 2 鲫鱼、草鱼、斑马鱼、虹鳟鱼 Rag1基因的外显子和内含子的比较

物种 Species	各外显子长度 The length of exons (bp)			各内含子长度 The length of introns (bp)	
	1	2	3	1	2
鲫鱼	308	1136	1748	105	891
草鱼	308	1136	1748	117	837
斑马鱼	308	1118	1748	88	850
虹鳟鱼	1465	1757			666

用 jellyfish软件对不同鱼类 Rag1基因的内含子碱基序列进行对比分析的结果表明:鲫鱼与斑马鱼第一内含子的同源性为 57.1%,与草鱼的同源性为 73.1%;鲫鱼与斑马鱼及草鱼的第二内含子的碱基序列同源性分别为 80.4%和 82.5% (图 7)。由

	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101	111	121	131
<i>Carassius auratus</i>	MEKRWSSDAFRASMPDELSP--KPSVWPKLFRVSMKAPLNETPVKENQ-----EVAIEVAGSPGSMWLLFGGSKENWESARGVDLKLQEDITHNLLKLCLOGSLRKAPSGEVQGLVE													
<i>Danio rerio</i>	MEKRWSSDAFRASMPDELSP--KPSVWPKLFRVSMKAPLNETPVKENQ-----EVAIEVAGSPGSMWLLFGGSKENWESARGVDLKLQEDITHNLLKLCLOGSLRKAPSGEVQGLVE													
<i>Cyprinus carpio</i>	MEKRWSSDAFRASMPDELSP--KPSVWPKLFRVSMKAPLNETPVKENQ-----EVAIEVAGSPGSMWLLFGGSKENWESARGVDLKLQEDITHNLLKLCLOGSLRKAPSGEVQGLVE													
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	MEKRWSSDAFRASMPDELSP--KPSVWPKLFRVSMKAPLNETPVKENQ-----EVAIEVAGSPGSMWLLFGGSKENWESARGVDLKLQEDITHNLLKLCLOGSLRKAPSGEVQGLVE													
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	MEET-----YAFPSMPAELGPFYSKPSDWIKLFRVSMKAPLNETPVKENQ-----EVAIEVAGSPGSMWLLFGGSKENWESARGVDLKLQEDITHNLLKLCLOGSLRKAPSGEVQGLVE													
Consensus	mekrwssdaprasmpeleshp kfsawkfklfrvrsmekaplnetpvkenq eva e agspgsmwllcfcgsksnwesargvdlklqeidthnllklclrlcglsirkapsgsevggdlle													
<i>Carassius auratus</i>	141	151	161	171	181	191	201	211	221	231	241	251	261	271
<i>Danio rerio</i>	SSICALRBNCKFLTVFVILKVFVVDVITMETVHPSLPCBHCWTAAMGGGCPSPITKTQIPDKPTISNCLCPKSSFGRIKRAKPLKASGLPKRIK--RDSSTFS--KAWRQTITDITVSGGKEVGLKLV													
<i>Cyprinus carpio</i>	SSICALRBNCKFLTVFVILKVFVVDVITMETVHPSLPCBHCWTAAMGGGCPSPITKTQIPDKPTISNCLCPKSSFGRIKRAKPLKASGLPKRIK--RDSSTFS--KAWRQTITDITVSGGKEVGLKLV													
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	SSICALRBNCKFLTVFVILKVFVVDVITMETVHPSLPCBHCWTAAMGGGCPSPITKTQIPDKPTISNCLCPKSSFGRIKRAKPLKASGLPKRIK--RDSSTFS--KAWRQTITDITVSGGKEVGLKLV													
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	ASUALRBNCKFLTVFVILKVFVVDVITMETVHPSLPCBHCWTAAMGGGCPSPITKTQIPDKPTISNCLCPKSSFGRIKRAKPLKASGLPKRIK--RDSSTFS--KAWRQTITDITVSGGKEVGLKLV													
Consensus	ssrcalrbnck twpevilkvfvdvttmetvhp slfchrcwtamgggcsptitktqipdkpts cnlcfpkssfgr grikaplk ahsplrik rdsse sgawrqtt n gggkevlklv													
<i>Carassius auratus</i>	281	291	301	311	321	331	341	351	361	371	381	391	401	411
<i>Danio rerio</i>	GRQGVVKNITQQQDHLSTKLIPTEVPADLRAVTCQWCHLLSFPVQSPCHLPCRCVITSRALGNCPTCNQHLNPSHLTPAKTFLATLSSPLLPSCGSDVVRDLSFRENCLDTHKESQEQITPSQND													
<i>Cyprinus carpio</i>	GRQGVVKNITQQQDHLSTKLIPTEVPADLRAVTCQWCHLLSFPVQSPCHLPCRCVITSRALGNCPTCNQHLNPSHLTPAKTFLATLSSPLLPSCGSDVVRDLSFRENCLDTHKESQEQITPSQND													
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	GRQGVVKNITQQQDHLSTKLIPTEVPADLRAVTCQWCHLLSFPVQSPCHLPCRCVITSRALGNCPTCNQHLNPSHLTPAKTFLATLSSPLLPSCGSDVVRDLSFRENCLDTHKESQEQITPSQND													
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	GRQGVVKNITQQQDHLSTKLIPTEVPADLRAVTCQWCHLLSFPVQSPCHLPCRCVITSRALGNCPTCNQHLNPSHLTPAKTFLATLSSPLLPSCGSDVVRDLSFRENCLDTHKESQEQITPSQND													
Consensus	grqgvvknitqeqdhlstklip evpadfl avtcqwdhllsfpvqspchlp crcvit sr algn ctpcnqhl nps hlt rpa kft l at l pl l pscgsdvrldsfrencl dthkeseqeqitpsqnd													
<i>Carassius auratus</i>	421	431	441	451	461	471	481	491	501	511	521	531	541	551
<i>Danio rerio</i>	GTLPVNKGGRFQWLLSLTRAGQRLRLDQVYKFAEKEBGGVSWCLTFLFLLALRAGHEHQADELANNQGRGPGLPFVCLATRVITFLSCSQTHMYRTVKATSGRQIPQPLTLNKAKEKLLPGHQFEWQ													
<i>Cyprinus carpio</i>	GTLPVNKGGRFQWLLSLTRAGQRLRLDQVYKFAEKEBGGVSWCLTFLFLLALRAGHEHQADELANNQGRGPGLPFVCLATRVITFLSCSQTHMYRTVKATSGRQIPQPLTLNKAKEKLLPGHQFEWQ													
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	GTLPVNKGGRFQWLLSLTRAGQRLRLDQVYKFAEKEBGGVSWCLTFLFLLALRAGHEHQADELANNQGRGPGLPFVCLATRVITFLSCSQTHMYRTVKATSGRQIPQPLTLNKAKEKLLPGHQFEWQ													
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	GTLPVNKGGRFQWLLSLTRAGQRLRLDQVYKFAEKEBGGVSWCLTFLFLLALRAGHEHQADELANNQGRGPGLPFVCLATRVITFLSCSQTHMYRTVKATSGRQIPQPLTLNKAKEKLLPGHQFEWQ													
Consensus	gylpvknkggrf qhll sltr agqlrl dlnqvk faeeeggdvksvcl tfl l alr agnkhqade lannqgr gflhpavclatrvit flscsqthmyrtvkatsgrqipqltl nkaekllpg hqfe wq													
<i>Carassius auratus</i>	561	571	581	591	601	611	621	631	641	651	661	671	681	691
<i>Danio rerio</i>	ALNVSSVWDGIDLSGWTISVDVPAITISARFRYDVALSALDLEEDIMBGLRERLDSICTSGPTVVVRESCDGMDVSEKNGGPAVPEKAVFSPTIMSISIRVGEDDGITIPQEQKNSLSLSCPLCLM													
<i>Cyprinus carpio</i>	ALNVSSVWDGIDLSGWTISVDVPAITISARFRYDVALSALDLEEDIMBGLRERLDSICTSGPTVVVRESCDGMDVSEKNGGPAVPEKAVFSPTIMSISIRVGEDDGITIPQEQKNSLSLSCPLCLM													
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	ALNVSSVWDGIDLSGWTISVDVPAITISARFRYDVALSALDLEEDIMBGLRERLDSICTSGPTVVVRESCDGMDVSEKNGGPAVPEKAVFSPTIMSISIRVGEDDGITIPQEQKNSLSLSCPLCLM													
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	ALNVSSVWDGIDLSGWTISVDVPAITISARFRYDVALSALDLEEDIMBGLRERLDSICTSGPTVVVRESCDGMDVSEKNGGPAVPEKAVFSPTIMSISIRVGEDDGITIPQEQKNSLSLSCPLCLM													
Consensus	alnvssvwdgildsgwtisvddv padtisarfr ydvals al dleedim bgl rler ldsict sgptvvv rescdgmdvsekn ggpavpekavf sptimsi sirvgeddgitipqeqknselscplclm													
<i>Carassius auratus</i>	701	711	721	731	741	751	761	771	781	791	801	811	821	831
<i>Danio rerio</i>	FVDESDEHTLAILGPVVAERKAMNESRLISVGLLSFRFFFGTGTDEINVRMBGLEASGTTICTLDSIRASQNMVLSTISNDENLERYETVETNPFSASDELDRVGVSAKFMETQPTLDAICDI													
<i>Cyprinus carpio</i>	FVDESDEHTLAILGPVVAERKAMNESRLISVGLLSFRFFFGTGTDEINVRMBGLEASGTTICTLDSIRASQNMVLSTISNDENLERYETVETNPFSASDELDRVGVSAKFMETQPTLDAICDI													
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	FVDESDEHTLAILGPVVAERKAMNESRLISVGLLSFRFFFGTGTDEINVRMBGLEASGTTICTLDSIRASQNMVLSTISNDENLERYETVETNPFSASDELDRVGVSAKFMETQPTLDAICDI													
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	FVDESDEHTLAILGPVVAERKAMNESRLISVGLLSFRFFFGTGTDEINVRMBGLEASGTTICTLDSIRASQNMVLSTISNDENLERYETVETNPFSASDELDRVGVSAKFMETQPTLDAICDI													
Consensus	fvdesdhetlailgpvvaerkanne xrlisvlgllsfrfffgt gtd e in vrmbgleasgttict lds irasqnmvlst isndenleryetv etnpfsasdel drv gvsakf metqpt l d aic di													
<i>Carassius auratus</i>	841	851	861	871	881	891	901	911	921	931	941	951	961	971
<i>Danio rerio</i>	GNATEFYKIPQDEIGVYQNSPSEERERVSALDQRLKQKLPVNMWGYARRLNTREAVEVCLVPSSEERREALKMDLYLQMKPVWRSTCPSDCPVQLQYTSYSSQFADLLSTFKTRYDGKITNYLHK													
<i>Cyprinus carpio</i>	GNATEFYKIPQDEIGVYQNSPSEERERVSALDQRLKQKLPVNMWGYARRLNTREAVEVCLVPSSEERREALKMDLYLQMKPVWRSTCPSDCPVQLQYTSYSSQFADLLSTFKTRYDGKITNYLHK													
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	GNATEFYKIPQDEIGVYQNSPSEERERVSALDQRLKQKLPVNMWGYARRLNTREAVEVCLVPSSEERREALKMDLYLQMKPVWRSTCPSDCPVQLQYTSYSSQFADLLSTFKTRYDGKITNYLHK													
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	GNATEFYKIPQDEIGVYQNSPSEERERVSALDQRLKQKLPVNMWGYARRLNTREAVEVCLVPSSEERREALKMDLYLQMKPVWRSTCPSDCPVQLQYTSYSSQFADLLSTFKTRYDGKITNYLHK													
Consensus	gnatefyki f qdei gevyqns p seererrvs al dqlrlkdkl pnmwngyarr l ntreave vclvps eerreal kmdlyl qmkpv wrstcp sdrp dqlqytsy ssqf adllst f ktrydgkit nylhk													
<i>Carassius auratus</i>	981	991	1001	1011	1021	1031	1041	1051	1061	1071	1081	1091	1101	1111
<i>Danio rerio</i>	TLAHVPEIVERDSIGANASBGWESGHLFRFRFNMNARQSKTFELEDVLQGWLYTSKYLQFWEAHGSAKAMQATFN--FEETPDEVDM--LEVPDF													
<i>Cyprinus carpio</i>	TLAHVPEIVERDSIGANASBGWESGHLFRFRFNMNARQSKTFELEDVLQGWLYTSKYLQFWEAHGSAKAMQATFN--FEETPDEVDM--LEVPDF													
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	TLAHVPEIVERDSIGANASBGWESGHLFRFRFNMNARQSKTFELEDVLQGWLYTSKYLQFWEAHGSAKAMQATFN--FEETPDEVDM--LEVPDF													
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	TLAHVPEIVERDSIGANASBGWESGHLFRFRFNMNARQSKTFELEDVLQGWLYTSKYLQFWEAHGSAKAMQATFN--FEETPDEVDM--LEVPDF													
Consensus	tlahvpeiver dsgiganasbgwesghl frfrnmnarqsktfeledvlqgwlyt sky lqfweahg sakamqatfn peetpdevdm levpdf													

图 5 推测的鲫鱼、斑马鱼、鲤鱼、草鱼和虹鳟鱼 RAG1 氨基酸序列比对

Fig. 5 Alignment of RAG1 putative amino acid sequences of *Carassius auratus*, *Danio rerio*, *Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idella* and *Oncorhynchus mykiss*

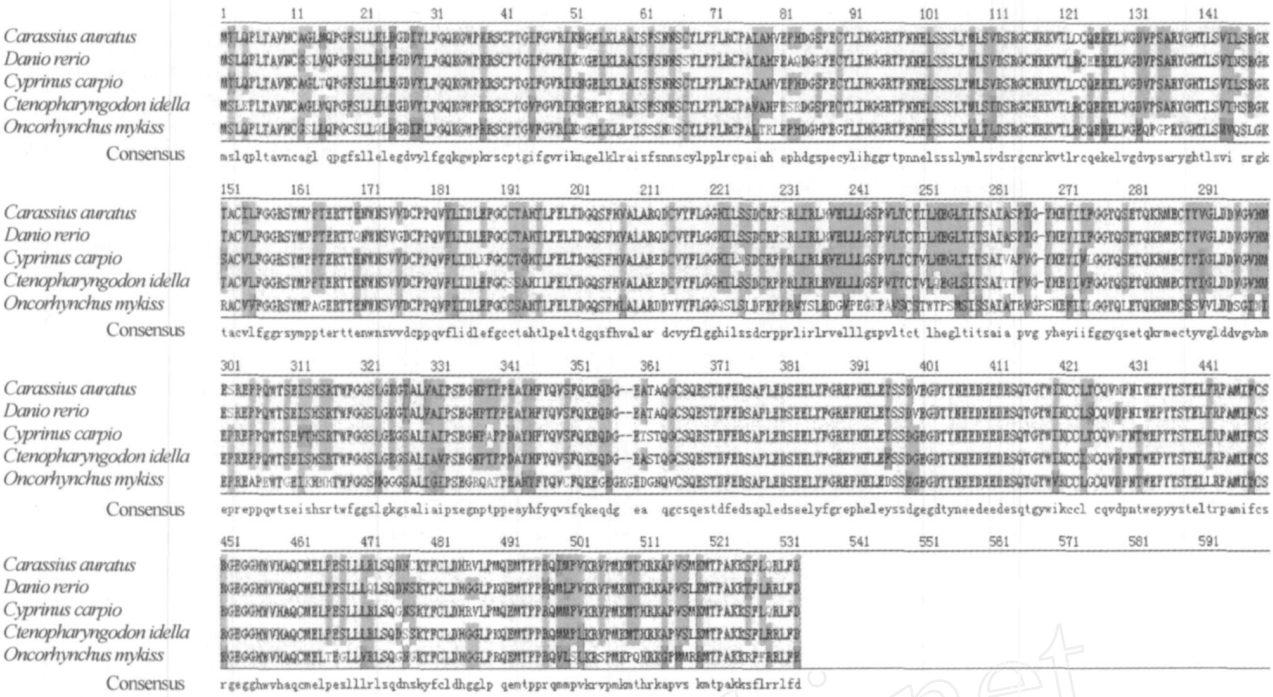


图 6 推测的鲫鱼、斑马鱼、鲤鱼、草鱼和虹鳟鱼 RA G2氨基酸序列比对

Fig. 6 Alignment of Rag2 putative amino acid sequences of *Carassius auratus*, *Danio rerio*, *Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idella* and *Oncorhynchus mykiss*

于第二内含子在这三种鱼之间高度保守,提示它可能具有某种重要的调控功能,于是我们利用在线转录因子结合位点分析软件 TFSEARCH (ver1.3)对鲫鱼第二内含子进行分析,结果显示该内含子中有许多可能的转录因子结合位点。这些转录因子包括 CdxA、GATA-1、GATA-2、SR Y和 SOX5等等。进一步对几种鱼类的第二内含子序列在 NCB I网站中进行 BLASTn对比分析,发现与性腺发育相关的两个转录因子 SR Y和 SOX5^[17]的结合位点序列(在鲫鱼 Rag1基因中位于第 2001位到第 2169位)在所有 Rag1基因结构已知的鱼类中都存在高度保守。

2.4 Rag1基因的表达分析

用 RT-PCR方法在发育至第 5天的鲫鱼胚胎中可以检测到低水平的 Rag1基因表达,在第 7天时其表达水平有明显提高(图 8 I)。组织特异性表达分析表明在鲫鱼成体的精巢和头肾中有较强表达,在肠和鳃有很弱表达,而在肌肉、胆囊、脑、心、肝和脾中没有检测到表达(图 8 III)。原位杂交分析表明,在受精后第 7天的鲫鱼胚胎的胸腺原基中可以检测到明显的 Rag1基因的表达,在受精后第 9天的胚胎中其表达信号更强(图 8 II)。

3 讨论

本实验的结果表明,不仅鲫鱼与斑马鱼、草鱼、鲤鱼、虹鳟鱼 Rag1基因的编码序列和氨基酸序列是非常保守的,具有高度的同源性,而且鲫鱼、斑马鱼、草鱼 Rag1基因的内含子序列也是高度同源的,特别是第 2内含子同源性高于 80%。鱼类 Rag1基因第二内含子在进化过程中的高度保守性说明该序列对该基因的选择性表达调节或功能的发挥可能具有至关重要的作用。转录因子结合位点的分析结果表明,在 Rag1基因第二内含子存在许多转录因子的结合位点,其中有一段在所有已知鱼类中都存在的保守区域是与性腺发育相关的转录因子 SR Y和 SOX5的可能结合位点。这些与基因表达调节有关的转录因子结合位点的存在,可能就是该非编码区域在进化上高度保守的原因。

依据 Rag1基因 ORF建立的系统进化树以及鲫鱼 Rag1基因两个内含子的序列及长度对比的结果来看,鲫鱼与草鱼 Rag1基因的同源性更高,与斑马鱼的同源性相对较低,这些都表明鲫鱼和草鱼的亲缘关系比鲫鱼和斑马鱼的更近一些。但用 Rag2基因 ORF所建立的鲫鱼、斑马鱼、草鱼、鲤鱼、虹鳟鱼

的系统进化树中,这些鱼类的亲缘关系与用 *Rag1* 所得到的结果不完全一致。这种不一致说明单纯根据一个基因的序列分析结果来确定不同物种的亲缘关系并不精确。其原因可能与鱼类是经历了三轮基因组加倍的脊椎动物有关。在鱼类特异性的第 3 次基因组加倍后的二倍体化过程中,两个不同的等位基因中哪一个等位基因被选择沉默和最终丢失可能是随机的。由这种加倍的祖先所进化而产生的鲫鱼、斑马鱼和草鱼中,鲫鱼和草鱼的 *Rag1* 基因可能是同一个等位基因进化而来的,斑马鱼的 *Rag1* 基因可能是由另一个等位基因进化而来的。而在 *Rag2* 基因座位上则鲫鱼和斑马鱼可能保留的是同

一个等位基因,而草鱼所保留的是另一个等位基因。原位杂交结果表明 *Rag1* 基因在鲤鱼^[18]、斑马鱼^[19,20]和鲫鱼的胸腺原基中均有表达。第 9 天的鲫鱼胚胎中 *Rag1* 基因原位杂交信号比第 7 天胚胎的原位杂交信号更强,说明该时期可能是鲫鱼免疫基因重组的活跃时期。与斑马鱼^[12]中相同,本实验也在鲫鱼的性腺中检测到了 *Rag1* 基因的表达。而在 *Rag1* 基因保守的第二内含子序列中存在可能与性腺发育相关转录因子的结合位点,也提示 *Rag1* 基因的表达可能与性腺的发育具有相关性。这些结果提示 *Rag1* 基因可能在减数分裂的性腺中参与了染色体的交换和重组过程,但这还需要进一步的实验来证明。

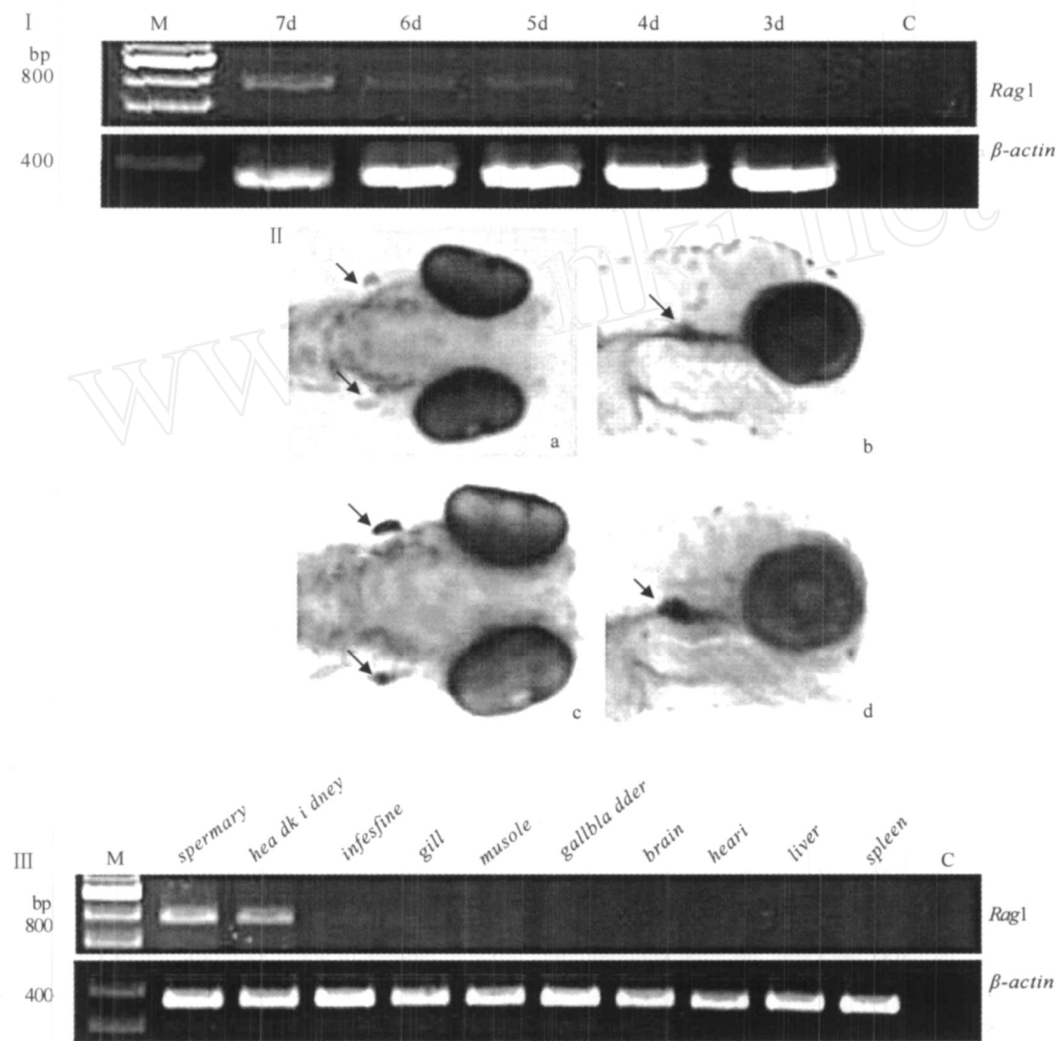


图 8 *Rag1* 基因在鲫鱼不同发育时期胚胎及不同成体组织和器官中的表达分析

Fig. 8 Expression analysis of *Rag1* in different developmental stage of embryo and tissues or organs in *Carassius auratus*
I. 不同发育阶段 RT-PCR 检测电泳图; II. 第 7、9 天胚胎原位杂交图 a, b. 第 7 天胚胎; c, d. 第 9 天胚胎; a, c. 背面观; b, d. 侧面观; III. 不同组织和器官的 RT-PCR 检测电泳图
I. *Rag1* expression in different developmental stages; II. Whole mount in situ hybridization analysis on embryos; a, b. Embryo of 7 dpf; c, d. Embryo of 9 dpf; a, c. Dorsal view; b, d. Lateral view; III. *Rag1* expression in difference adult tissues

参考文献:

- [1] Schatz D G, Oettinger M A and Baltimore D. The V (D) J recombination activation gene, RAG1 [J]. *Cell*, 1989, **59**: 1035—1048
- [2] J E Hesse, M R Lieber, K Mizuuchi, et al V (D) J recombination: a functional definition of the joining signals [J]. *Genes and Development*, 1989, **3**: 1053—1061
- [3] Fugmann SD, Lee A I, Shockett P E, et al The rag proteins and V (D) J recombination: Complexes, ends, and transposition [J]. *Annual Review of Immunology*, 2000, **18**: 495—527
- [4] Masaki H, Masaharu M, Toshiyuki T, et al Reexpression of *Rag-1* and *Rag-2* genes in activated mature mouse B cells [J]. *Science*, 1996, **274**: 2092—2093
- [5] Chun J J, Schatz D G, Oettinger M A, et al The recombination activating gene-1 (RAG1) transcript is present in the murine central nervous system [J]. *Cell*, 1991, **64**: 189—200
- [6] Carlson L M, Oettinger M A, Schatz D G, et al Selective expression of RAG-2 in chicken B cells undergoing immunoglobulin gene conversion [J]. *Cell*, 1991, **64**: 201—208
- [7] Sullivan J P, Lundberg J G, Hardman M. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: *Siluriformes*) using *Rag1* and *Rag2* nuclear gene sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, **41** (3): 636—662
- [8] Wang X, Li J, He S Molecular evidence for the monophyly of East Asian groups of *Cyprinidae* (Teleostei: *Cypriniformes*) derived from the nuclear recombination activating gene 2 sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, **42** (1): 157—170
- [9] Venkatesh B, Erdmann M V, Brenner S Molecular synapomorphies resolve evolutionary relationships of extant jawed vertebrates [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, **98** (20): 11382—11387
- [10] Hansen J D and Kaattari S L. The recombination activating gene 1 (*Rag1*) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): cloning, expression, and phylogenetic analysis [J]. *Immunogenetics*, 1995, **42**: 188—195
- [11] Hansen J and Kaattari S L. The recombination activating gene 2 (*Rag2*) of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Immunogenetics*, 1996, **44**: 203—211
- [12] Willett C E, Cherry J J, Steiner L A. Characterization and expression of the recombination activating genes (*Rag1* and *Rag2*) of zebrafish [J]. *Immunogenetics*, 1997, **45** (6): 394—404
- [13] Greenhalgh R, Olesen C E and Steiner L A. Characterization and expression of recombination activating genes (*Rag1* and *Rag2*) in *Xenopus laevis* [J]. *Journal of Immunology*, 1993, **151**: 3100—3110
- [14] Thisse C, Thisse B, Schilling T F, et al Structure of the zebrafish *snail 1* gene and its expression in wild-type, spadetail and no tail mutant embryos [J]. *Development*, 1993, **119** (4): 1203—1215
- [15] McMahan C J, Difilippantonio M J, Rao N, et al A basic motif in the N-terminal region of Rag1 enhances V (D) J recombination activity [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, **17** (8): 4544—4552
- [16] Moshe J, Sadofsky. The RAG proteins in V (D) J recombination: more than just a nuclease [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, **29**, 7: 1399—1409
- [17] Yang D, Yu L N. Sex and sex identification of fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30** (2): 221—226 [杨东, 余来宁. 鱼类性别与性别鉴定. 水生生物学报, 2006, **30** (2): 221—226]
- [18] Huttenhuis H B, Huising M O, van der Meulen T, et al Rag expression identifies B and T cell lymphopoietic tissues during the development of common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2005, **29** (12): 1033—1047
- [19] Trede N S, Zon L I Development of T-cells during fish embryogenesis [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1998, **22**: 253—263
- [20] Willett C E, Zapata A G, Hopkins N, et al Expression of zebrafish *Rag* genes during early development identifies the thymus [J]. *Developmental Biology*, 1997, **182** (2): 331—341

SEQUENCE CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF RAG GENES IN GOLDFISH

FAN Si-Gang^{1,2}, ZHANG Qiong-Yu^{1,2} and LUO Chen²

(1. College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410006; 2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

Abstract: Recombination activating genes (Rag) are key genes in specific immunity system of vertebrate and also used as one of the molecular marker for analysis of vertebrate evolution. Goldfish, *Carassius auratus*, with strong adaptive and diseases-resistant abilities, is one of the important freshwater economic fish extensively cultivated in China. And it also appears to be an excellent model animal for the evolution study of fish genome for its varied ploidy and abounding genetic diversity. The goldfish *Rag* genes have not been cloned and the specificity of goldfish specific immunity system has not been studied yet. In the present study, goldfish *Rag1* and *Rag2* genes were cloned by polymerase chain reaction (PCR) methods, and the temporal and spatial expression pattern of RAG-1 were examined with methods of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and whole mount in situ hybridization. The total length of the genomic sequence of the goldfish *Rag1* gene from the initiation codon to the stop codon is 4188 bp, which composed of three exons and two introns. The length of exon 1, 2 and 3 is 308bp, 1136bp and 1748bp respectively. The length of intron 1 and 2 is 105bp and 891bp respectively. The entire open reading frame (ORF) is 3192bp long, which predicated encoding a protein of 1063 amino acids. The goldfish *Rag2* has no intron in its open reading frame, the length of the genomic sequence from the initiation codon to the stop codon is 1593bp, which predicated encoding a protein of 530 amino acids. The putative structure of RAG protein in *Carassius auratus* are consisted of both an N-terminal domain and a core region. Comparative analysis on the sequences of ORFs and protein amino acid of *Carassius auratus*, *Danio rerio*, *Ctenopharyngodon idella*, *Cyprinus carpio* and *Oncorhynchus mykiss* revealed that both *Rag1* and *Rag2* are highly conserved in evolution. Phylogenetic tree analysis on these fish based on *Rag1* ORF suggested that *Carassius auratus* was more closely related to *Cyprinus carpio*, and which based on *Rag2* ORF indicated that *Carassius auratus* was more closely related to *Danio rerio*. The second intron of the *Rag1* was also highly conserved during evolution. Transcription factor binding sites analysis on the conserved region of this intron suggested that there were some putative transcription factor binding sites in it. A common conserved area which is appeared to be the SRY and SOX5 transcription factor binding sites was observed in all the examined fish, suggesting that the expression of *Rag1* may have some relationship with the development of gonad. Tissue-specific expression analysis by RT-PCR methods, and it revealed that *Rag1* expressed mainly in the spermary and head kidney. This observation suggested that the RAGs directed DNA recombination took place not only in immunity tissue but also in gonads. *Rag1* expression was first detected at the 5d post-fertilization by RT-PCR. Strong mRNA in situ hybridization signal was detected in the thymus primordium at the 9d post-fertilization, suggesting that this period might be an active DNA recombination stage of immunogenes in goldfish.

Key words: Recombination activating genes; Cloning; Gene Expression; *Carassius auratus*