

研究简报

银鲫 3 个肌球蛋白轻链基因 cDNA 的克隆与特征分析

石耀华 刘 军 桂建芳

(中国科学院水生生物研究所; 淡水生态与生物技术国家重点

实验室; 武汉发育生物学中心, 武汉 430072)

CLONING AND CHARACTERIZATION OF THREE MYOSIN LIGHT CHAIN cDNA FROM SILVER CRUCIAN CARP

SHI Yao-Hua, LIU Jun and GUI Jian-Fang

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of

Sciences, Wuhan Center for Developmental Biology, Wuhan 430072)

关键词: 银鲫; 肌球蛋白轻链; 克隆

Key words: Silver crucian carp; Myosin light chain; cDNA cloning

中图分类号: Q75 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)03-0308-06

银鲫 (*Carassius auratus gibelio*), 因具有雌核发育的生殖能力而其天然群体中又存在一定比例(约 5%—20%)的雄性个体^[1], 被认为是进行进化遗传和个体发育调控研究的独特模型动物^[2]。最近, 确凿的分子标记证据表明, 银鲫同时具有雌核发育和两性生殖的能力^[3-6]。银鲫两种不同的生殖方式意味着其卵子中存在微妙的调控体系, 隐含有控制两性生殖与雌核生殖的关键因子。为了揭示这些因子及其调控机制, 采用抑制差减杂交技术, 先后构建了银鲫卵子与其两性近亲物种彩鲫卵子的差减 cDNA 文库^[7]、银鲫胚胎发育不同阶段的差减 cDNA 文库^[8], 并从中分离鉴别出了一批值得进一步研究的候选基因^[8-10]。作者在进行心跳期胚胎 cDNA 文库与尾芽期胚胎 cDNA 文库差减杂交, 发现银鲫肌球蛋白的轻链 1、轻链 2 和轻链 3 基因在心跳期胚胎中差异表达^[8]的基础上, 利用抑制差减杂交与 SMART 3' RACE 和 5' RACE 相结合技术, 分离克隆出了银鲫肌球蛋白的轻链 1、轻链 2 和轻链 3 的 cDNA, 并对其特征进行了分析与比较。

1 材料和方法

1.1 实验鱼 D 系银鲫取自中国科学院水生生物研究所关桥实验场, 注射绒毛膜促性腺激素和鲤垂体催熟, 红鲤精液人工授精, 室温(20℃)发育至尾芽期和心跳期。

1.2 RNA 分离、SMART cDNA 合成和抑制差减杂交文库构建 按超离法提取总 RNA 的试剂盒(Pharmacia)和磁珠法纯化 mRNA 试剂盒(Promega)手册分离纯化雌核发育银鲫尾芽期和心跳期 RNA。按 SMART cDNA 合成试剂盒(Clontech)和抑制差减杂交试剂盒(Clontech)手册合成尾芽期和心跳期 SMART cDNA 和构建相应时期差减 cDNA 文库^[8]。

1.3 肌球蛋白差减片段的检出 挑取差减文库克隆进行 PCR 和斑点杂交, 测序后通过 Blastx 在 NCBI 数据库(包含 GenBank, EMBL, DDBJ, PDB 的所有序列)查询序列同源性, 获得肌球蛋白片段, 进行虚拟 Northern 杂交^[8]。

1.4 3' RACE 和 5' RACE 克隆肌球蛋白编码序列 根据 SMART cDNA 的 Smart 寡聚核苷酸和 CDS 引物的序列合成了 SMART 5' 引物(5'-AAC GCA GAG TAC GCG GG-3')和 SMART 3' 引物(5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CT_(30 N-1 N-3')), 分别锚定于 SMART cDNA 的 5' 和 3' 端。

根据抑制差减杂交所得到的肌球蛋白轻链片段的开放阅读框设计上下游引物从心跳期 SMART cDNA 扩增全长。上游引物和 SMART 3' 引物扩增 cDNA 的 3' 末端, 下游引物和 SMART 5' 引物扩增 cDNA 的 5' 端。PCR 扩增条件: 94℃ 5min; 94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 1min, 35 循环; 72℃ 5min。5' 和 3' 末端之间有部分核苷酸重叠, 去掉重叠部分即得到 cDNA 全长。

收稿日期: 2002-05-08; 修订日期: 2002-12-20

基金项目: 国家自然科学基金(30130240); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX 2-SW-303)资助

作者简介: 石耀华(1970—), 男, 湖北省咸宁市人; 博士; 研究方向: 鱼类发育生物学

通讯作者: 桂建芳, E-mail: Jfgui@ihb.ac.cn

1	CCGGCTTCTTGACTTCTGCCCCCTCGCTCCTGCACCCCAAACTCCATC
C 50	ATGGCTGGAGAATTCTCTGCTGACCAGATTGAGGACTTCAAAGAGGCCITTTGGTCTCTTC
	M A G E F S A D Q I E D F K E A F G L F
110	GACAGAGTTGGTGACAACAAGGTTGCCTACAACCAAGTTGCTGACATCATGCGTGCCCGG
	D R V G D N K V A Y N Q V A D I M R A P
170	GGACAGAACCCACCAACAAAGACGTGAAGAAAATCCTGAGTGACCCATCTGCTGACGAT
	G Q N P T N K D V K K I L S D P S A D D
230	ATGGCCAACAAAGAATTGACTTTGATGCTTTCCTGCCAATGCTGAAGACCGTTGACGCC
	M A N K R I D F D A F L P M L K T V D A
290	GTCCAGAAGGGTACCTATGATGACTACGTTGAGGGTCTGCGCGTCTTCGACAAAGAGGGC
	V Q K G T Y D D Y V E G L R V F D K E G
350	AACGGCACAGTGATGGGCGCTGAGCTGCGCATTGTGCTCTCAACACTGGGTGAGAAGATG
	N G T V M G A E L R I V L S T L G E K M
410	ACCGAGCCCGAGATCGACTCTCTCATGCAAGGACAGGAGGACGAGAACGGCAGTGTCAC
	T E P E I D S L M Q G Q E D E N G S V H
470	TATGAGGATTTCTGTC AAGCACATCATGTCTGTGTAAGAGGCGTCCGCTGAGAGAGTGGT
	Y E D F V K H I M S V STOP
530	GAAGAAGGCTGAACATATATCTGCAGACCCCATGGTGTCAGGACATCCATTCTGTTTTGAA
590	GACCAATAAATAAAGGACTATGGGATGTCACTTCTAAACCATTCAAGTTGTTCCCTTTTA
650	TTTGTTTTCTCCCTCTCGCCAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAGTTACATCGTCC
710	TTTCATGCAGTTGACCTACTTGCCCTTCTGTTCCGCCCGGGGCGGCCTTCCACAGTGGGA
770	TGGAGACCGGGAAGAAAGAAAGGCCACTCATGAAGTGAGGGTTGGGTTTCTTTCTTTC
830	TCCACCATCCAGGTTACAACAGCACCCG

图 1 银鲫肌球蛋白轻链核苷酸序列和推测的对应氨基酸序列。A 肌球蛋白轻链 1; B 肌球蛋白轻链 2; C 肌球蛋白轻链 3。克隆 5' 端的下游引物用下划线标出, 克隆 3' 端的上游引物用双下划线标出。多聚腺苷酸加尾信号用黑体标出

Fig. 1 Nucleotide sequences and putative amino acid sequences of silver crucian carp myosin light chain cDNA. A myosin light chain 1; B myosin light chain 2; C myosin light chain 3. Downstream primers used in cloning 5' ends were underlined and upstream primers used in cloning 3' ends were double underlined. The putative polyadenylation signal was shown in bold

2.2 与其他物种肌球蛋白氨基酸序列同源性比较

银鲫比小鼠、爪蟾、鲤以及人的肌球蛋白轻链 1 分别少 2、4、7、8 个氨基酸, 主要是由于 N 端缺失了 1—9 个氨基酸。银鲫与同源性最高的爪蟾有 46 个氨基酸存在差异, 与同源性最低的鲤肌球蛋白轻链 1a 有 75 个氨基酸存在差异与小鼠和人的氨基酸分别有 58 和 62 个氨基酸不同。

银鲫肌球蛋白轻链 2 编码的氨基酸羧基端比斑马鱼多最后一个氨基酸, 即谷氨酸; 与人和小鼠相比, 除了多出谷氨酸之外, 在第 10、11 位均多出了两个谷氨酰胺。银鲫肌球蛋

白轻链 2 与斑马鱼仅有 8 个氨基酸不同, 与小鼠和人则分别有 50、51 个氨基酸存在差异。

银鲫肌球蛋白轻链 3 与鲤和斑马鱼的氨基酸数目相同, 均为 151 个氨基酸, 小鼠的肌球蛋白轻链 3 编码 150 个氨基酸。银鲫、鲤和斑马鱼比小鼠多出了第 2 位和第 3 位的甘氨酸和谷氨酸, 但是少了小鼠第 81 位的天冬酰胺。银鲫肌球蛋白轻链 3 的第 40 位和第 53 位与鲤不同, 分别为脯氨酸和丝氨酸而非亮氨酸和甘氨酸。斑马鱼肌球蛋白轻链 3 有 11 个氨基酸与银鲫不同, 小鼠的有 55 个氨基酸与银鲫存在差异。

A	人	MAPKK-DVKKPVAAAAAPAPAPAPAPAPAKP-KEEKIDLSAIKMEFSKEQQDEFKEA 60
	小鼠	MAPKK-DVKKP---AA---APAPAPAPAPAPAKP-KEEKIDLSAIKIEFSKEQQEDFKEA 60
	鲤鱼 1a	MAPKK-DAKKP--EPAKKAEPAPAPAPAPAPEAPPKPAAVDLSGVKVDFNQDQLEDYREA 60
	银鲫	MAPKE---KE-----EPKPVAAPKPPEPEPPKEPEFNPAEVKIEFTAEQIEDFKDA 60
	爪蟾 1av	MPPKKPEPKKE-----APKPAAPPAAPEPPKEKAFDPKSVTVEFAADQIEEFKEA 60
		* ** : * * *, ** *, * * , : : : : * * : : : : *

银鲫	MTEPEIDSLMQGQEDENGSVHYEDFVKHIMSV 152
鲤鱼	MTEPEIDSLMQGQEDENGSVHYEDFVKHIMSV 152
斑马鱼	MSEPEIDALMQGQEDENGMVHYEAFVKNIMSV 152
家鼠	MKEEEVEALLAGQEDSNGCINYEAFVKHIMSV 152
	* * * : : * : * * * * * * : : * * * * * * *

图 2 银鲫与其他物种肌球蛋白轻链氨基酸序列比较 A 肌球蛋白轻链 1; B 肌球蛋白轻链 2; C 肌球蛋白轻链 3. * 下标号的是相同的氨基酸

Fig. 2 Comparison of silver crucian carp myosin light chain amino acid sequences with other species. A myosin light chain 1; B myosin light chain 2; C myosin light chain 3. The star indicates identical amino acids

3 讨论

肌球蛋白是肌纤维的主要组成成分之一,是一种多功能的马达蛋白,广泛存在于肌肉和非肌肉细胞,是细胞骨架的重要组成部分,为肌肉收缩、细胞物质运输和细胞分裂等提供动力。肌球蛋白是一个超级家族,存在多种类型的重链和轻链。目前为止,肌球蛋白轻链虽然已经在包括斑马鱼和鲤在内的众多物种中克隆,然而,经查询 NCBI 数据库发现,尚未在斑马鱼和普通鲤中同时克隆到 3 种肌球蛋白轻链,鲫中也未见报道。差减杂交和差异显示技术已广泛用于分离鉴定疾病相关基因、胚胎发育特定阶段特异表达基因以及细胞分化和器官形成决定基因^[11,12]。抑制性差减杂交引进差异表达基因 PCR 扩增技术,从而克服了传统方法耗时太多,假阳性率很高^[13],不宜于分离鉴定表达丰度低的基因的缺点^[14-16]。在筛选银鲫心跳期抑制性差减杂交质粒文库时得到了肌球蛋白轻链 1、2、3 酶切片段,拼接后直接获得了轻链 3 基因 cDNA 的开放阅读框及 5' 和 3' 端部分非编码区。虚拟 Northern 杂交实验结果表明,肌球蛋白轻链在银鲫尾芽期不表达而在心跳期表达,证实肌球蛋白轻链基因为胚胎发育阶段特异性表达。尾芽期和心跳期之间还有包括肌肉效应期在内的多个胚胎发育阶段。肌肉效应期胚胎在卵膜内间歇性地剧烈扭动,肌肉收缩和胚胎的扭动需要消耗大量能量。肌球蛋白作为肌纤维的重要组成部分之一,与肌动蛋白等相互作用,为该发育提供动力。肌球蛋白轻链是调控链,调控重链的表达。因此,肌球蛋白轻链应在尾芽期与肌肉效应期之间某个时期开始表达。小鼠肌球蛋白轻链 3 在受精后第 9.5d 开始表达^[17]。其他研究也表明肌球蛋白轻链基因在胚胎发育过程中的激活受到严格调控^[15,16],肌球蛋白轻链及其增强子异常会影响中胚层和体节等正常发育^[17,18]。

自 20 世纪 70 年代中叶首例互补 DNA(cDNA)克隆问世以来,涌现了许多获取特定基因全长 cDNA 序列的新方法,然而,5' 端序列的获得仍然不是一件容易的事。Smart cDNA 技术利用改进的 oligo(dT) Primer 合成第一链 cDNA,反转录酶的末端转移酶活性在第一链 cDNA 末端加 oligo(C),再利用 3' 末端含有 oligo(G)的 Smart oligonucleotide 合成第二链,大大提高了全长 cDNA 获得的可能性。根据抑制性差减杂交获得心跳期特异性表达肌球蛋白轻链 1 和 2 的片段设计引物,以心跳期 Smart cDNA 为模板分别克隆了银鲫肌球蛋白轻链 1 的开放阅读框和轻链 2 cDNA 全长。已有的研究表明,Smart cD-

NA 技术和 3' RAC 与 5' RACE 技术相结合是克隆全长 cDNA 的有效途径^[19,20]。

银鲫与斑马鱼肌球蛋白轻链 2 和肌球蛋白轻链 3 氨基酸同源性超过 90%,银鲫与鲤的肌球蛋白轻链 3 的氨基酸同源性更是高达 98.6%。银鲫与小鼠和人的肌球蛋白轻链 2 和肌球蛋白轻链 3 同源性均不足 70%^[21-23]。这一结果与银鲫同这些物种间的亲缘距离相一致。银鲫和斑马鱼、鲤属于进化上比较原始的生物类群,而且同属鲤科鱼类,亲缘关系较近,因而它们间的分子进化水平相近,遗传物质间的同源性要比相对亲缘关系较远的人和小鼠高得多。然而,银鲫与其他物种肌球蛋白轻链 1 的同源程度却与它们间的亲缘关系不一致。银鲫同鲤的亲缘关系比银鲫同爪蟾等要近得多,由此银鲫同鲤肌球蛋白轻链 1 的同源性应比同另外几个物种间的同源性高得多,然而,银鲫肌球蛋白轻链 1 与鲤肌球蛋白轻链 1a 和爪蟾、鼠、人肌球蛋白轻链 1 的同源性分别为 59.68%、77.44%、68.82% 和 66.67%,银鲫同鲤肌球蛋白轻链 1a 的同源性最低,比银鲫同爪蟾间同源性低 17.76%。银鲫同其他物种间肌球蛋白轻链 1 氨基酸序列的一致性与它们间亲缘关系不一致。这种不一致性的原因仍需要进一步研究和分析。

参考文献:

[1] Jiang Y G, Liang S C, Chen B D. Biological effect of heterologous sperm on gynogenetic offspring in *Carassius auratus gibelio* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1983, **8**(1): 1-13[蒋一, 梁绍昌, 陈本德. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应. 水生生物学报, 1983, **8**(1): 1-13]

[2] Gui J F, Liang S C, Zhu L F, et al. Discovery of two different reproductive development modes of the eggs of artificial multiple tetraploid allogynogenetic silver crucian carp [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1993, **38**(4): 332-337

[3] Gui J F. Retrospects and prospects of studies on the mechanism of natural gynogenesis in silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Science Foundation in China*, 1997, **11**: 11-16[桂建芳. 银鲫天然雌核发育机理研究的回顾与展望. 中国科学基金, 1997, **11**: 11-16]

[4] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Genetic evidence for gonochoristic reproduction in genogenetic silver crucian carp (*carassius auratus gibelio Bloch*) as revealed by RAPD assays [J]. *J Mol Evol*, 2000, **51**: 498-506

[5] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Analysis of genetic heterogeneity among

- five gynogenetic clons of silver crucian carp, *carassius auratus gibelio* Bloch, based on detection of RAPD molecular markers[J]. *Cytogenet and Cell Genet.* 2000, **88**: 133—139
- [6] Zhou L Gui J F. Genetic diversification analyses between gonochoristic offspring of two silver crucian carp[J]. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, 2001, **34**: 169—176 [周莉, 桂建芳. 两个银鲫克隆间两性生殖子代的遗传多样性分析. 实验生物学报, 2001, **34**: 169—176]
- [7] Fan LC, Xie J, Wang Y, *et al.* Construction of oocyte cDNA libraries of gynogenetic silver crucian carp and gonochoristic color crucian carp and cloning of their cyclin A1 cDNAs[J]. *Acta Hydrobiol Sinica*, 2000, **24**(6): 573—581 [樊连春, 谢京, 汪洋, 等. 银鲫和彩鲫卵母细胞 cDNA 文库构建及周期蛋白 A1 的 cDNA 克隆. 水生生物学报, 2000, **24**(6): 573—581]
- [8] Shi YH, Liu J, Xia J H, *et al.* . Screen for stage specific expression genes between tail bud stage and heartbeat beginning stage in embryo genesis of gynogenetic silver crucian carp[J]. *Cdl Research*, 2002, **13**: in press
- [9] Fan L C, Yang S T., Gui J F, Differential screening and characterization analysis of the egg envelope glycoprotein ZP3 cDNAs between gynogenetic and gonochoristic crucian carp[J]. *Cell Research*, 2001, **11**(1): 17—27
- [10] Xie J, Wen J J, Chen B, *et al.* Differential gene expression in fully grown oocytes between gynogenetic and gonochoristic crucian carps [J]. *Gene*, 2001, **271**: 109—116
- [11] Lisitsyn N, Lisitsyn L, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes[J]. *Science*, 1993, **259**: 946—951
- [12] Martin Laurent F, Tuinen D. Differential display analysis of RNA accumulation in arbuscular mycorrhiza of pea and isolation of a novel symbiosis regulated plant gene[J]. *Mol Gen Genet*, 1997, **256**: 37—44
- [13] Sompayac L, Jane S, Bum T C, *et al.* Overcoming limitations of the mRNA differential display technique[J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23**: 4738—4739
- [14] Hedrick S M, Cohen D I, Neilson E A, *et al.* Isolation of cDNA clones encoding T cell specific membrane associated proteins[J]. *Nature*, 1984, **308**: 149—153
- [15] Sargent T D, Dawid I B. Differential gene expression in the *Xenopus laevis* [J]. *Science*, 1983, **222**: 135—139
- [16] Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, *et al.* Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue specific cDNA probes and libraries[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 6025—6030
- [17] Jiang P, Song J, Gu G, *et al.* Targeted deletion of the MLC1f/3f downstream enhancer results in precocious MLC expression and mesoderm ablation[J]. *Dev Biol*, 2002, **243**(2): 281—293
- [18] Bolzem A M, Leonardi C M, De Bernardi F, *et al.* Induction of somites by myosin Mrna[J]. *Exp Cdl Biol*, 1983, **51**(4): 228—238
- [19] A Laboratory Guide to RNA. Isolation Analysis, and Synthesis[M]. Krieg PA, Wiley-Liss, Inc., 1996, 273—321
- [20] Matz M, Lukyanov S, Bogdanova, E, *et al.* Amplification of cDNA ends based on template switching effect and step out PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27**: 1558—1560
- [21] Moutou K A, Canario A V, Mamuris Z, *et al.* Molecular cloning and sequence of *Sparus aurata* skeletal myosin light chains expressed in white muscle: developmental expression and thyroid regulation[J]. *J Exp Biol* 2001, **204**(17): 3009—3018
- [22] Thiebaud P, Rescan P Y, Barillot W, *et al.* Developmental program expression of myosin alkali light chain and skeletal actin genes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1519**(1—2): 139—142
- [23] Xu Y, He J, Wang X, *et al.* Asynchronous activation of 10 muscle specific protein (MSP) genes during zebrafish somitogenesis[J]. *Dev Dyn*, 2000, **219**(2): 201—215