

文章编号: 1674 - 5566(2012)03 - 0321 - 10

鲤 *CYR61* 基因的克隆、表达及系统进化树的构建

孙婷^{1,2}, 刘伟^{1,3}, 徐鹏¹, 孙效文¹

(1. 中国水产科学研究院 水产生物应用基因组研究中心, 北京 100141; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 3. 大连海洋大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 通过鲤 (*Cyprinus carpio*) 基因组序列与斑马鱼 (*Danio rerio*) *CYR61* 基因编码区全序列的比对得到了 *CYR61 A*、*CYR61 B* 和 *CYR61 C* 共 3 条序列。分别克隆、测序得到其开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 分别是 1 158 bp、1 053 bp、1 107 bp, *CYR61 A* 和 *CYR61 C* 得到完整编码区, 都是由 5 个外显子和 4 个内含子构成, 分别编码 385、368 个氨基酸, 其理论等电点值分别是 7.83、8.54, 分子量 (Mw 值) 分别为 42.55 ku、40.83 ku。鲤 3 个 *CYR61* 基因具有高度同源性, 并且均含 IB、vWC、TSP1、CT 4 个模块。分子系统学分析表明鲤 *CYR61* 基因与其他物种 *CYR61* 基因具有高度同源性, 且 *CYR61 C* 与其他高等物种的 *CYR61* 同源性更高, 利用 MEGA 5.0 计算出 *CYR61 A*、*CYR61 B* 和 *CYR61 C* 的分化时间早于鲤和斑马鱼的物种分化。*CYR61 C* 在 13 个组织中均有表达, 在卵巢中表达最高, 肠、脑、鳃次之, 在其他组织中表达较低且在心脏中表达最低。*CYR61 A* 在精巢、肠、鳃中表达较高。*CYR61 B* 在精巢和脑中表达最高, 肠、肌肉、卵巢次之。实时荧光定量 PCR 分析 *CYR61* 3 个复制在鲤胚胎发育时期的表达, 都是在 0 h 相对表达量最高, 显著降低至 18 h 或 24 h, 随后逐渐升高并在 6 d 时下降。

研究亮点: *CYR61* 基因是 CCN 家族中的成员, 其对胚胎发育、软骨形成和伤口愈合具有重要作用。本研究对此基因进行了克隆、转录表达, 结果证明此基因的 3 个拷贝具有不同的功能, 为进一步分析这个基因的生理功能、进化作用等提供了有价值的资源和信息。

关键词: 鲤; *CYR61*; 克隆; 分子系统进化树; 半定量 RT-PCR; 实时荧光定量 PCR; 基因表达

中图分类号: S 917

文献标志码: A

水产品是发展中国家人们摄取蛋白质的主要方式之一, 而鲤科鱼类是世界上三大水产养殖鱼类之一, 鲤作为中国淡水养殖的重要品种具有蛋白含量高, 脂肪多为不饱和脂肪酸等优点, 因此关于鲤的生长发育也受到广泛关注。CCN 家族生物学功能广泛, 可通过与其他信号分子如生长因子受体间的串话, 促进细胞生长、粘附、迁移, 诱导细胞凋亡及胞外基质的产生, 参与胚胎发育、血管生成、创伤修复、肿瘤生长等多种生物学过程, 对鲤的生长发育具有重要作用^[1-2]。*CYR61* (富含半胱氨酸 61 或血管诱导生成因子 61) 是 CCN 家族中第一个被克隆的基因, 其编码

的蛋白是支持细胞粘附和调控细胞粘附的富含半胱氨酸的分泌性蛋白^[3-5]。*CYR61* 对胚胎发育、软骨形成和伤口愈合具有重要作用, *CYR61* 还可刺激内皮细胞迁移, 提高生长因子诱导的 DNA 合成^[3]并在活体中诱导血管形成^[6-9]。但 *CYR61* 基因在鲤生长发育过程中的表达规律及在血管生成和胚胎发育中的调控作用还未见报道。本文以鲤为研究对象, 克隆了 *CYR61* 基因并利用半定量 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 检测其在不同组织和胚胎发育时期的表达差异, 为进一步研究 *CYR61* 基因对鱼类生长发育特别是在血管生成和胚胎发育中的作用提供基础研究。

收稿日期: 2011-10-12 修回日期: 2011-11-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2011AA100401); 公益性行业 (农业) 科研专项 (200903045)

作者简介: 孙婷 (1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类遗传学。E-mail: suntinghf@126.com

通讯作者: 孙效文, E-mail: sunxw2002@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 材料

实验用鲤采于中国水产科学研究院黑龙江水产研究所松浦养殖场,暂养于中国水产科学研究院水产生物应用基因组研究中心。剪取新鲜的鲤各组织(血液、脑、肝、脾、头肾、体肾、肠、鳃、心脏、皮肤、肌肉、卵巢和精巢)分别保存在RNAsafeguard试剂中并储存在-80℃冰箱里。

1.2 RNA的提取与cDNA的合成

用TRIZOL试剂盒(Invitrogen, USA)分别提取血液、脑、肝、脾、头肾、体肾、肠、鳃、心脏、皮肤、肌肉、卵巢和精巢的总RNA,并用无核苷酸水处理。反转录为cDNA之前用NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA)检测RNA的含量并用1.5%琼脂糖胶检测其完整性。每个组织取3 μg RNA先用DNase I (Amplification grade, Invitrogen)前处理去掉其中的DNA,按照反转录试剂盒说明书步骤[引物为Oligo(dT)]合成cDNA第一条链,最后用RNase去掉剩余RNA。cDNA样品均用无核苷酸(DEPC)水稀释10倍备用。

1.3 *CYR61*基因在鲤中的克隆、测序与进化树的构建

利用斑马鱼*CYR61*基因序列与基因组序列进行BLASTN比对得到鲤*CYR61*基因序列。利用包括各个组织的全鱼RNA(3 μg)反转录得到全鱼cDNA,用primer 5.0设计扩增*CYR61* A、*CYR61* B、*CYR61* C基因的引物*CYR61* A 1F/1R、*CYR61* B 1F/1R、*CYR61* C 1F/1R及内参引物β-actin-F/R(表1),设计的引物要跨越至少一个内含子,以防基因组的污染而产生假阳性现象,所有的引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成,使用前将引物稀释至10 mmol/L。扩增得到的片段用PMD-18T载体[宝生物工程(大连)有限公司]克隆并测序(ABI 3130xl Genetic Analyzer),测序PCR反应10 μL体系包括cDNA 3 μL、3 μmol/L上游引物1 μL、Bigdye 0.5 μL、5倍稀释的seqbuffer 2 μL,最后补水3.5 μL至终体积10 μL,PCR条件为98℃预变性5 min,循环程序为95℃变性10 s,55℃退火5 s,60℃延伸4 min,共40个循环,4℃保温。通过BLASTN比对

分析与*CYR61*基因开放阅读框序列相似度较高的其他物种*CYR61*基因开放阅读框序列,使用软件MEGA 5.0中的Jukes-Cantor单参数模型和Kimura双参数模型计算斑马鱼和鲤*CYR61*基因序列间的分歧距离,根据基因分化时间的计算公式^[10-11] $T = K/2r$ 来计算各基因序列间的分化时间,其中*K*代表核苷酸序列间的分歧距离,*r*代表碱基置换率(3.51×10^{-9})。用MEGA 5.0构建系统进化树,计算方法为邻位相连法(Neighbor-joining),自展内部分枝法(Bootstrapping),评定进化树的可靠性,重复次数为1 000,利用BioEdit 7.0.1软件进行*CYR61*基因氨基酸序列的翻译和比对。

表1 实验所设计的引物序列

Tab. 1 The primers used in the experiment

引物	序列
<i>CYR61</i> A 1F	ATCCTGAGTGTCCGGCTTGTC
<i>CYR61</i> A 1R	GTAACGCCGAGCAGTGAAGC
<i>CYR61</i> B 1F	GTATCAGCACGGAGAGGATTCCAG
<i>CYR61</i> B 1R	AGCCATTATGGAGTGTGGCCCGTT
<i>CYR61</i> B 2F	CCAGTGC AAGCTTGTTCGAG
<i>CYR61</i> B 2R	ACACCAGCCACAGGTACGAG
<i>CYR61</i> C 1F	GGGCTGTTACCGTCATTCTT
<i>CYR61</i> C 1R	GTGGATGTCGTTGAAGAGTC
<i>CYR61</i> C 2F	GCAGCCAATCGCAATACACC
<i>CYR61</i> C 2R	ACGCAGGAGCCGCAGTATCT
β-actin-F	TGCAAAGCCGGATTGCTGG
β-actin-R	AGTTGTTGACAATACCGTGC

1.4 *CYR61*基因在鲤各组织中的表达

本实验采用半定量RT-PCR^[12]的方法检测*CYR61*基因在鲤各组织的表达,用primer 5.0设计引物*CYR61* A 1F/1R、*CYR61* B 1F/1R、*CYR61* C 1F/1R以及β-actin-F/R(表1)。先确定适当的循环数,使扩增产物处在平台期前的线性增长范围内,并在1.5%琼脂糖凝胶上检测。基因β-actin与*CYR61*的PCR反应体系为:1.0 μL鲤cDNA模板,2.0 μL 10×buffer,2.0 μL 0.2 mmol/L dNTPs,0.1 μL 1.0 U *Taq*酶,1.2 μL 2.0 mmol/L MgCl₂,1 μmol/L引物,最后补水至终体积20 μL。反应程序:95℃预变性5 min;循环程序为95℃变性30 s,退火30 s,72℃延伸30 s,(13~36个循环);最后72℃延伸10 min;4℃保温。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物,溴化乙锭染色后在紫外凝胶成像仪(BIO-RAD)灯下

观察、确定循环数。根据每个目的基因所确定的循环数对目的基因进行 13 个鲤组织 cDNA 的 PCR 扩增并将扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 *CYR61* 基因在鲤各发育时期的表达

本研究选取了鲤受精后 0 h, 6 h, 18 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h 的受精卵, 及孵化后 3 d 和 6 d 的仔鱼提取 RNA 并转录成 cDNA(同上), 运用实时定量(荧光定量)法检测鲤各发育时期的表达。所用引物(*CYR61* A 1F/1R、*CYR61* B 2F/2R、*CYR61* C 2F/2R、 β -actin-F/R)序列如表 1 所示。目的基因的标准曲线是以全鱼 cDNA 10 倍系列(1.0×10^{-1} , 1.0×10^{-2} , 1.0×10^{-3} , 1.0×10^{-4} , 1.0×10^{-5} 倍)稀释为模板得到, PCR 反应体系为: 1.0 μ L 鲤 cDNA (200 ng/ μ L), 0.3 μ L (10 μ mol/L) 上下游引物混合液, 7.5 μ L SYBR Green reagent(东洋纺), 最后补水至终体积 15 μ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min; 循环程序为 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s(40 个循环)。每个时期设 3 个重复, 所有样品检测均设置阴性对照(水)以排除假阳性结果。反应在 7500 实时定量 PCR 仪(applied biosystems)进行。每个目的基因的相对表达以内参 β -actin 为参考基

因, 数据由 7500PCR 仪自带的软件分析得到, 数据处理采用 2^{-Delta Delta C(T)}法^[13], 数据结果均以平均值 \pm 标准差表示。利用 SPSS 15.0 单因素方差分析进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 鲤 *CYR61* 基因家族全长 cDNA 序列及分析

利用斑马鱼 *CYR61* 基因家族与鲤基因组进行 BLASTN 比对并以鲤 cDNA 为模板进行克隆测序验证, 确定了 3 个鲤 *CYR61* 基因, 分别与斑马鱼中 *CYR61* 基因相对应: *CYR61* A、*CYR61* B 和 *CYR61* C。

2.1.1 *CYR61* 基因的 cDNA 序列结构及分析

鲤 *CYR61* A 全长 cDNA 为 1 158 bp, 如图 1(a) 所示, 由 5 个外显子组成, 包含起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG, 编码 385 个氨基酸残基的多肽, 与斑马鱼 *CYR61* A 核苷酸序列具有 84% 的相似性, ExPASy 在线软件预测其编码的蛋白质分子量为 42.55 ku, 等电点为 7.83。鲤 *CYR61* B 获得 1 053 bp 的 cDNA 序列, 如图 1(b) 所示, 与斑马鱼 *CYR61* B 核苷酸序列具有 77% 的相似性。鲤 *CYR61* C 全长 cDNA 为 1107 bp, 如图 1(c) 所示, 也是由 5 个外显子构成, 包含起始密码

1 M S P L R I I A R Q G H F I T L V L L S W A A V E
1 ATGTCCTCCCTCTAAGGATCATAGCAAGGCAAGGACATTTTCATCACACTGGTCTGCTGTCATGGGCGCTGTGGAG
26 V Q G G C P L K C S C P S P P S C P P G I S S V
76 GTGCAAGGAGGCTGTCCACTGAAATGCTCATGTCTTCCTCGCCCCCTCGTGTCTCCGGGTATCAGTTCGGTT
51 L D S C G C C R V C A R Q F N Q D C S P N E P C D
151 CTGGACTCATGTGGGTGTTGTCCGGTCTGTGCCAGGAGTTTAAACCAGGACTGCAGCCCTAATGAGCCCTGGCAG
76 H I K G L V A A G D P D R G V C R A A Q
226 CACATTAAGGACTGCGCTGCCACCTGGTGGCCGCTGGGGACCCTGACAGAGGCGTGTGTAGAGCTGAAGCTCAA
101 G R P C E L D G R V Y Q H G E D F Q P T C E H Q C
301 GGTGCTCTGTGAGTTGGATGGACGGTCTATCAGCACGGCGAGGACTTTCAGCCAACCTGTGAGCATCAGTGC
126 T C V D G V V G C V P L C P H H I S L P D W R C S
376 ACGTGTGGATGGAGTAGTCCGGTCCGCTCCCACTGTGCCACACCACATCTCTCTACCCGACTGGCGCTGTTCC
151 R R R L T K L S G R C C Q E W V C D D D N R I A E
451 CGCCGCCCTCACAAACTCTCCGGCCGCTGTGCCAGGAGTGGGTGTGTGATGATGACAACCGCATTGCTGAA
176 V D P L P D A H P Q K H T D L T G N E L L V A P S
526 GTGGATCCGTTGCCAGACGACATCCACAAAAACACAGACCTTACAGGCAACGAGTACTTGTAGCTCCATCT
201 T S W D S S A G A P Y Q E W I S S S K S H D F L P
601 ACTTCTGGGACAGCAGTGCAGGAGCCCCTTATCAAGAGTGGATTTTCATCTTCTAAGTCCCACGACTTCCCTCCA
226 P T C L L Q V T D W S P C S A T C G M G V S S R V
676 CCCACTGCTTACTGCAGGTCACTGATTGGTCCCGTCTCAGCCACCTGTGGAATGGGCGTGTCCAGCCGTGTA
251 T N S N P E C R L V S E T R L C Q I Q E C Q L N P
751 ACCAATAGTAATCCTGAGTGTCCGCTTGTGAGTAACTAGGCTCTGTGATACAGAGTGTGGCCTCAACCT
276 A P S L K K G K K C Q R T T R P L K P V Q I V F A
826 GCACCATCACTGAAGAAAGAAAGAAATGTCAGAGAACCACAGCACTGAAACCTGTGCAGATCGTATTGCA
301 G C F T A R R Y R P R S C G S C S D G R V C V P S
901 GGATGCTTCACTGCTCGCGTTACCGGCTCGTTCATGTGGATCCTGCTCAGACGGTTCGGTCTGTGTTCCCTCT
326 V T R T I R L H F H C P E P E Q D D F T R N V M W
976 GTGACAGTACAATCCGTCTACACTTCACTGTCCGAGCCAGAACAGCAGCTTACCCGCAACGTCATGTGG
351 I H R C S C S Q R N A S R Q G L T S Q A E F F S L P
1051 ATACACCGCTGCAGCTGCAGTCAAAGAAACAGCAGAGGGCTGACATCACAAGCAGAGTTCTCAGTCTGCCA
376 N D I H T Y T H G H *
1126 AATGATATACACATACACACACGGACATTAG

(a) *CYR61* A

```

1 S R G C S R P C S C P P S P P S C P L G V S W V L
1 TCCAGAGGCTGTCCCGTCCCTGCTCCTGCCCGTCTCCACCTCCTGTCCGCTCGGAGTGAGCTGGGTGCTG
26 D E C G C K V C A Q F N Q D C G P D R P C D H
76 GATGAGTGGGCTGTGTAAGGTGTGCGCCAGCAGTTC AAC CAGGACTGTGGCCCTGACCGACCTGTGACCAC
51 I K G L R C H L G A G G D P R R G L C R A E A Q G
151 ATCAAGGGCTGCGCTGCCACCTAGGGCCGGAGGGGACCTCGACGTGGTCTCTGCAGAGCTGAGGCTCAGGGC
76 R P C E F A G R V Y Q H G E D F Q P S C Q H Q C S
226 CGTCCGTGTGAGTTTGTGGTGTGTATCAGCACGGAGAGATTCCAGCCAGCTGTGACACCAGTGCAGC
101 C M D G V V G C M P L C F H N I P L P R R H C A N
301 TGTATGGATGGTGTGGTGTGTATGCCGTGTGTCCACACAACATCCCTCGCCCGCAGACACTGCGCCAAC
126 P R L E T P P G R C C E E W L C D D D N S I R E D
376 CCGCGTCTGGAGACGCGCCGGGACGCTGCTGTGAGGAGTGGCTGTGTGACGATGATAACAGCATCAGGGAAGAC
151 P P D P R P H T P S N H I S K L I Q S P N S V L
451 CCACGGACCCCGTCCCATCACACCCATCCAACACATCAGAACTCATAACAGAGCCCTAACAGCGTCTGT
176 S R R G S F Q E W V S L S V S R V P F P S S E C E
526 TCACGGAGGGCTCCTTTCAAGAGTGGTGTCCCTGTGCGTGTCTCGGGTTCCTTCCCATCGTCCGAATGTTT
201 P Q T T D V W S G C S A S C G H F G I S S R V T N N N
601 CCCAGACCACTGACTGGTCCGGATGTTCTGCTTCTGCGGGTTGGCATCTCGAGTCGTGTGACCAATAATAAT
226 A Q C K L V R E S R L C Q I R E C D I T P A M K K
676 GCCCAGTCAAGCTTGTTCGAGACTCTCGCTTTGCCAGTACAGAGTGTGACATCACTCCGCTATGAGAAA
251 G K T C R Q T V R S R E P E Q I V P A G C S T A R
751 GAAAGACGTGCAGGCAAACGGTGAGGTCTCGGGAACGGAGCAGATCGTGTTCGCGGGCTGCTACGGCTCGC
276 R Y R P R T C G W C V D G R C C Q P S S S R T V R
826 CGTACCGCCTCGTACCTGTGGTGTGTGGAGCGCAGGTGCTGTGACCCGCTCATCCCGCACGGTGGCC
301 L R E R C P D G E N I T R D V M W I Q R C R C S K
901 CTGCGCTTCCGCTGCCCGACGGGAGAACATCACCGTACGTCATGTGGATCCAGCGTCCGCTGCAGCAAG
326 S F C G V Q G E R S S P T I S L H N D I H T F S H
976 AGCTTCTGCGGGTTCAGGAGAGCATCCTCACCCACATCAGCCTTACAACGACATACACCTTCTCTCAC
351 *
1051 TGA

```

(b) *CYR61 B*

```

1 M F T W A V T V I L I A H F S V V F S S C P A T C
1 ATGTTTACTTGGGCTGTACCGTCACTTCTATTGCACACTTATGTTGGTCTTCTCCAGCTGCCAGCGACATGC
26 S C P L E L P K C A P G V S L V S D G C G C C K V
76 TCATGTCCGCTAGAGCTTCCCAAATGCGCGCCTGGAGTCACTTGGTGTGAGTGGCTGCGGCTGCTGCAAAGTG
51 C A R Q L N E D C S K T E P C D H T K G L E C N L
151 TGTGCCAGACAGTGAACGAAGACTGCAGCAAGACAGAGCCATGCGATCACACCAAAGGGTGGAGTGAACCTC
76 G A S H G A T R G I C R A K S E G R P C E Y N S R
226 GGGGCCAGCCAGGGGCCACCAGAGGATCTGCCGAGCCAAATCTGAGGGCAGACCATGCGAGTACAACAGCAGG
101 I Y Q N G E S F Q P N C K H Q C T C I D G A V G C
301 ATCTACCAGAATGGAGAGAGTTTCCAGCCAACTGCAAGCACCAGTGCACCTGCATCGATGGGCAGTGGGCTGC
126 I P L C P Q E L S L P T L G C A N P R L V K V P G
376 ATTCCGCTTGGCCCAAGAGCTCTCCCTGCCAGTGGGCTGCGCCAACCCAGGCTGGTCAAAGTGCAGGC
151 Q C C E E W V C D D G K S R E S T D K L F G N D P
451 CAGTGTGTGAGGAATGGGTCTGCGATGATGGGAAGTCTAGGGAATCCACCGACAAGCTGTTGGCAACGATCCA
176 M V D T S E S D L T S K N E F I S I I K A G L K S
526 ATGGTTGACGATTCTGAGAGCGACTCACAGCAAGACGAGTTCATCTCCATCATTAAGCCGAGCTCAAATCC
201 L P A F R S Q P E S R Q F E K C I V Q T T P W S Q
601 TTGCCTGCATTCCGATCGCAGCCGAATCCCGCAGTTTGAAGTGCATAGTGCAGACCCTCCCTGGTCCCAA
226 C S K T C G T G I S T R I T N D N G E C K L V K E
676 TGCTCCAAGACCTGCGGCACTGGAATCTCCACCAGGATAACCAATGACAACGGCAATGCAAGTTGGTTAAGGAG
251 T R I T C E V R P C S Q S Q Y T S L K K K G K A C N R
751 ACCAGGATTCGGAAGTCCGTCATGCAGCCAATCGAATACACCAGCTCAAGAAGGAAAGAAATCAACCGG
276 T K K S M Q P V K P T Y A G C S S L K K Y R V R Y
826 ACCAAGAAGTCCATGACCGCGTGAAGTTCACCTACGCGGATGCTCCAGCCTGAAGAAGTACCGCGTCAGATAC
301 C G S C V D G R C C S P Q Q T R T I R V K F R C E
901 TCGGGTCTCGGTGGATGGCCGCTGCTGCAGTCCACAGCAGACCCGACCATCCGCGTCAAGTCCGCTGCGAG
326 D G D T F N K N V M M I E S C K C T Y N C A H G N
976 GATGGGACACCTTCAACAAGAAGCTATGATGATCGAGTCTGCAAGTGCACCTTACAACCTGCGCCATGGCAAC
351 D A T Y P F Y R L F N D I H K F R D *
1051 GATGCCACTACCCTTCTACAGACTCTTCAACGACATCCACAAGTTCAGAGACTGA

```

(c) *CYR61 C*

图 1 ORF 序列及其所翻译的氨基酸序列

Fig. 1 ORF nucleotide and deduced amino acid sequences

ATG 表示起始密码子; * 表示终止密码子; *CYR61* 基因的 4 个模块分别用灰色标记。

子 ATG 和终止密码子 TGA, 编码 368 个氨基酸残基的多肽, 与斑马鱼 *CYR61 C* 核苷酸序列具有 79% 的相似性, ExPASy 在线软件预测编码的蛋

白质分子量为 40.83 ku, 等电点为 8.54。

用 SMART 在线软件分析鲤 *CYR61 A*、*CYR61 B* 和 *CYR61 C* 的氨基酸序列结构得知 *CYR61 A*、

CYR61 B 和 *CYR61 C* 均含有 4 个模块如图 2。如图 3 所示,多氨基酸序列比对显示鲤 *CYR61* 基因 3 个复制间具有高度同源性,但第 3 和第 4 模块存在氨基酸残基数量的差异,推测可能导致 *CYR61* 的 3 个复制间出现功能上的差异。

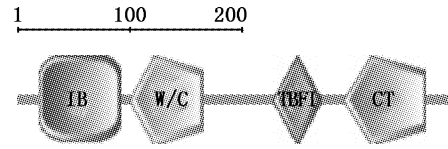


图 2 鲤 *CYR61* 编码序列的结构

Fig. 2 The structure of common carp *CYR61* ORF

	5	15	25	35	45	55	65	75
<i>CYR61 A</i>	MSPLRIIARQ	GHFITLVLLS	WAAVEVQGGC	PLKGCSPSSP	PSCPPGISSV	LDSCGCRCRV	ARQFNQDCSP	NEPCDHIKGL
<i>CYR61 B</i>	-----	-----	-----SRGC	SRPCSCPPSP	PSCPLGVS	WV LDECGCCKVC	AQFNQDCGP	DRPCDHIKGL
<i>CYR61 C</i>	-----MF	TWAVTVILIA	HFSVVFS	SSC PATCSCPLEL	PKCAPGVSLV	SDGCGCKVC	ARQFNEDCSK	TEPCDHIKGL
	85	95	105	115	125	135	145	155
<i>CYR61 A</i>	RCHLVAAGDP	DRGYCRAEAQ	GRPCELDGRV	YQHGEDFQPT	CEHQCTCVDG	VVGCVPLCPH	HISLPDWRC	RRRLTKLSGR
<i>CYR61 B</i>	RCHLGAGGDP	RRGLCRAEAQ	GRPCEFAGRV	YQHGEDFQPS	CQHQCSMDG	VVGCMPCLPH	NIPLPRRICA	NPRLETPPGR
<i>CYR61 C</i>	ECNFGASHGA	TRGLCRAKSE	GRPCEYNSRI	YQNGESFQPN	CKHQCTCIDG	AVGCIPLCPQ	ELSLPTLGA	NPRLVKVPQG
	165	175	185	195	205	215	225	235
<i>CYR61 A</i>	CCQEWCDDD	NRIAEVDPLP	DAHPQKHTDL	TGNELLVAPS	TSWDSAGAP	YQEWISSKS	HDFLPPT-CL	LQVTDWSPCS
<i>CYR61 B</i>	CCEEWLCCDD	NSIREDDPDP	RPHHTPSNHI	S--KLIQSPN	SVLSRRG--S	FQEWVLSVS	RVPFSSSECF	FQITDWSGCS
<i>CYR61 C</i>	CCEEWVCCDDG	KSRESTDKLF	GNDPMVDDSE	S-DLTSKNEF	ISIIKAGLKS	LPAFRSQPES	RQ--FEKCI	VQITPWSQCS
	245	255	265	275	285	295	305	315
<i>CYR61 A</i>	ATCGMGVSSR	VTNSNPECLR	VSETRLQIQ	EGGLNPAPSL	KKGKKCQRTT	RPLKPVQIVF	AGCFTARRYR	PRSCGSCSDG
<i>CYR61 B</i>	ASCGFGISSR	VTNNAQCKL	VRESRLQIR	ECDIPTA--M	KKGKTCRQTV	RSREPEQIVF	AGCSTARRYR	PRTCGWCVDG
<i>CYR61 C</i>	KTCGTGISTR	ITNDNGECKL	VKETRICEVR	PCSQSQYTSL	KKGKKCNRTK	KSMQPVKFTY	AGCSSLKKYR	VRYCGSCVDG
	325	335	345	355	365	375	385	
<i>CYR61 A</i>	RVCVPSVTRT	IRLHFHCPEP	EQDDFTRNVM	WIHRCSCSQR	NSRQGLTSA	EFFSLPNDIH	TYTHGH	
<i>CYR61 B</i>	RCQPPSSSRT	VRLRFRCPDG	E--NITRDVM	WIQRCSKSKS	FCGVQGERSS	PTISLHNDIH	TFSH--	
<i>CYR61 C</i>	RCCSPQQTRT	IRVKFCEDG	D--TFNKNVM	MIESCCKTYN	CAHGNDATY	PFYRLFNDIH	KFRD--	

图 3 鲤 *CYR61* 基因氨基酸序列的比对

Fig. 3 The BLASTN result of *CYR61* in common carp

CYR61 基因的 4 个模块分别用灰色标记。

2.1.2 鲤 *CYR61* 基因家族的进化分析

进化关系分析采用鲤 3 个 *CYR61* 基因与斑马鱼、人 (*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*)、家鼠 (*Rattus norvegicus*)、原鸡 (*Gallus gallus*)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 等进行 Clustal W 比对,用 MEGA 5.0 中邻接 (Neighbor-joining, NJ) 法进行进化树的构建确定其进化位置。如图 4 所示,鲤 *CYR61 A*、*CYR61 B* 分别与斑马鱼 *CYR61 A* 和 *CYR61 B* 聚类,随后共同聚类。人、牛 (*Bos taurus*) 与家鼠、小鼠等哺乳动物聚类在一起,最后同鲤 *CYR61 C* 和斑马鱼 *CYR61 C*、非洲爪蟾、非洲蛙 (*Xenopus (Silurana) tropicalis*)、原鸡、斑胸草雀 (*Taeniopygia guttata*) 共同聚类在一个大群里。通过对比其他物种 (如人、小鼠) 现有的基因组序列发现 *CYR61 A*、*CYR61 B* 是鱼类独有的。各物种 Genebank 序列号见表 2。

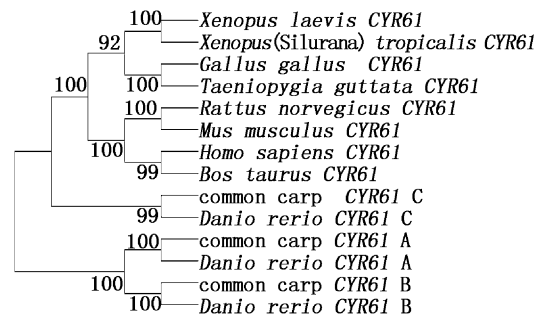


图 4 基于不同物种 *CYR61* 基因核苷酸序列构建的分子系统树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *CYR61s* nucleotide sequences.

利用 MEGA 5.0 软件中的 Jukes-Cantor 单参数模型和 Kimura 双参数模型计算各序列间的分歧距离和分化时间 (表 3、表 4),在斑马鱼和鲤

中, *CYR61 A* 与 *CYR61 C*、*CYR61 B* 与 *CYR61 C* 的分歧距离大于 *CYR61 A* 与 *CYR61 B* 的分歧距离, 年, *CYR61 B* 与 *CYR61 C* 的分化时间约为 90 百万年, *CYR61 A* 与 *CYR61 B* 的分化时间约为 68 百万年。

表 2 不同物种 *CYR61* 基因 ORF 序列的 GenBank 序列号

Tab. 2 Nucleotide sequences of *CYR61* used for phylogenetic tree construction and multiple sequence alignments

物种	基因	数据库	序列号
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	<i>CYR61 A</i>	GenBank	GQ273493.1
	<i>CYR61 B</i>	GenBank	NM_001080987.1
	<i>CYR61 C</i>	GenBank	NM_001001826.1
人 <i>Homo sapiens</i>	<i>CYR61</i>	GenBank	NM_001554.4
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	<i>CYR61</i>	GenBank	NM_001031563.1
家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	<i>CYR61</i>	GenBank	NM_031327.2
小鼠 <i>Mus musculus</i>	<i>CYR61</i>	GenBank	NM_010516.2
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	<i>CYR61</i>	GenBank	NM_001086439.1
非洲蛙 <i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	<i>CYR61</i>	GenBank	NM_001105514.1
牛 <i>Bos taurus</i>	<i>CYR61</i>	GenBank	NM_001034340.1
斑胸草雀 <i>Taeniopygia guttata</i>	<i>CYR61</i>	GenBank	XM_002191908.1

表 3 斑马鱼和鲤 *CYR61* 基因间的分歧距离

Tab. 3 The divergence distance of *CYR61* gene sequences in zebrafish and common carp

	ZF A	CC A	ZF B	CC B	ZF C	CC C
ZF A		0.181 604	0.468 757	0.469 774	0.647 199	0.682 719
CC A	0.180 152		0.487 527	0.478 125	0.639 105	0.673 480
ZF B	0.467 391	0.485 629		0.258 895	0.600 995	0.658 620
CC B	0.465 847	0.474 771	0.255 650		0.588 348	0.640 214
ZF C	0.641 204	0.636 743	0.594 961	0.585 776		0.233 064
CC C	0.671 621	0.666 922	0.648 070	0.633 851	0.231 572	

注: 对角线以下代表基于 Jukes-Cantor 单参数模型所得分歧距离; 对角线以上代表 Kimura 双参数模型所得分歧距离。

表 4 斑马鱼和鲤 *CYR61* 基因的分化时间

Tab. 4 The divergence time of *CYR61* gene sequences in zebrafish and common carp 百万年

	ZF A	CC A	ZF B	CC B	ZF C	CC C
ZF A		25.87	66.78	66.92	92.19	97.25
CC A	25.66		69.45	68.11	91.04	95.94
ZF B	66.58	69.18		36.88	85.61	93.82
CC B	66.36	67.63	36.42		83.81	91.20
ZF C	91.34	90.70	84.75	83.44		33.20
CC C	95.67	95.00	92.32	90.29	32.99	

注: 对角线以下代表基于 Jukes-Cantor 单参数模型所得分化时间; 对角线以上代表 Kimura 双参数模型所得分化时间; 阴影为鲤 *CYR61 A*、*CYR61 B*、*CYR61 C* 间的分化时间。

2.2 鲤 *CYR61* 基因 mRNA 在组织中的表达

CYR61 基因在组织中的表达用半定量方法检测。实验分别用 6 个不同循环数 (21、24、27、30、33、36) 对目的基因进行循环数的摸索, 使其处在平台期前的线性增长范围内, 分析定量扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳。如图 5 所示, *CYR61 A* 在 33 个循环达到最亮, 36 循环的亮度基本保

持不变, 说明在 33 循环已进入平台期, 最后选取 32 为 PCR 扩增循环数。同理, *CYR61 B* 在 30 个循环进入平台期, 故最后选取 29 个循环。 *CYR61 C* 在 30 个循环进入平台期, 最后 *CYR61 C* 选取 29 个循环进行 PCR 扩增。 β -actin 在 23 个循环进入平台期, 故最后选取 21 个循环。

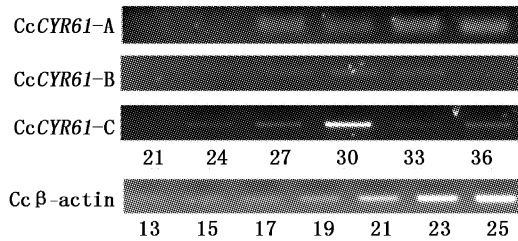


图 5 目的基因与 β -actin 循环数确定的电泳图

Fig. 5 The amplification numbers of *CYR61* and β -actin and the figures mean the amplification numbers

图 6 为鲤 *CYR61* 基因及 β -actin 在各组织中表达的凝胶电泳结果,利用 image J 分析得出目的

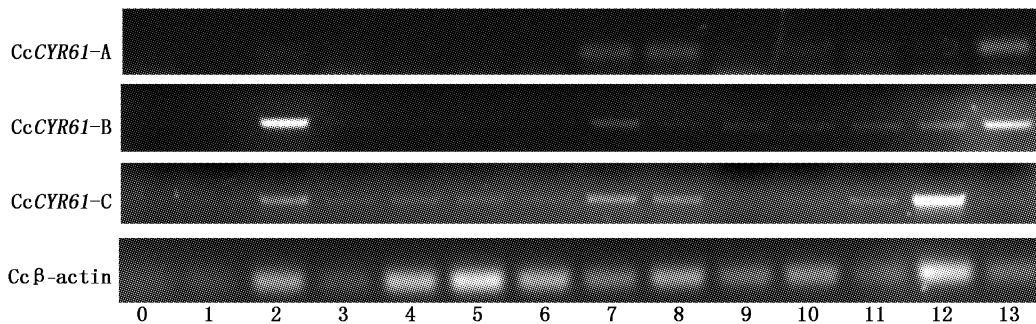


图 6 鲤 *CYR61* 基因与 β -actin 在 13 个组织中的表达电泳图

Fig. 6 The expression of *CcCYR61* and *Ccβ-actin* in 13 tissues

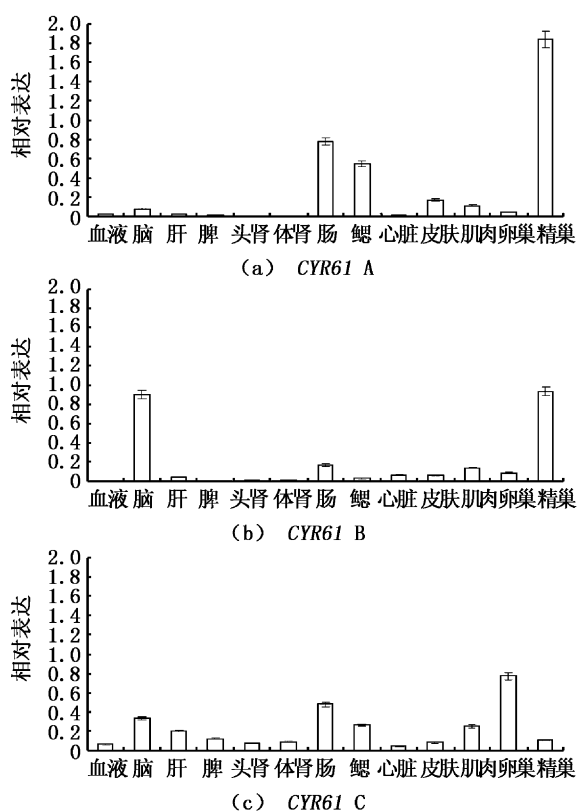
2.3 实时荧光定量 PCR

鲤 *CYR61* 基因在胚胎发育时期的表达用实时荧光定量相对定量中的 $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ 法进行检测。如表 5 所示,*CYR61 A*、*CYR61 B* 和 *CYR61 C* 基因在鲤的 9 个胚胎发育时期均检测到表达,*CYR61 A* 和 *CYR61 C* 在受精后 0 h 相对表达量最高,随后显著下降直至 18 h ($P < 0.05$),推测与受精卵的细胞增殖有关,在受精后 24 h 显著升高随后降低至 48 h,从 48 h 开始升高到 3 d 时达到最高,3 d 时 *CYR61 C* 的相对表达量甚至接近 0 h 的表达水平,推测 *CYR61 A* 和 *CYR61 C* 两者的功能可能存在一定的相关性。*CYR61 B* 在受精后 0 h 表达量最高,显著降低直至 24 h ($P < 0.05$),36 h 后逐渐升高,受精后 3 d 达到最高水平随后降低。推测 *CYR61* 基因对胚胎发育具有重要功能并持续到孵化以后的生长发育时期。

基因在各组织表达的灰度值,分别除以 β -actin 在各组织表达的灰度值,得出相对灰度值,即为目的基因相对表达量。如图 7 所示, *CYR61 A* 在精巢中表达最高,肠、鳃、皮肤次之,在脑、肌肉、血液、肝、体肾等组织中表达较低或检测不到。*CYR61 B* 在精巢和脑中表达最高,肠、肌肉、卵巢次之,在其他组织中表达较低或检测不到。*CYR61 C* 在 13 个组织中均有表达,在卵巢中表达最高,肠、脑、鳃次之,在其他组织中表达较低且在心脏中表达最低。推测鲤 *CYR61* 基因的 3 个复制已经分化出了空间表达差异,有可能会有一些功能上的异化。

4 讨论与结论

CYR61 基因是 CCN 家族的重要成员之一,参与调节不同的发育过程,特别是在胚胎发育的血管生成中具有重要的调控作用。通过对鲤 *CYR61* 基因的克隆和表达研究有助于从分子水平阐明 *CYR61* 在鲤血管生成和胚胎发育中的调控机理。本实验得到鲤 3 个 *CYR61* 基因,分别是 *CYR61 A*、*CYR61 B* 和 *CYR61 C*。*CYR61 A* 全长 cDNA 为 1 158 bp,编码 385 个氨基酸残基的多肽。*CYR61 B* 获得 1 053 bp 的 cDNA 序列。*CYR61 C* 全长 cDNA 为 1 107 bp,编码 368 个氨基酸残基的多肽。鲤 *CYR61 A*、*CYR61 B* 和 *CYR61 C* 与相对应的斑马鱼 *CYR61* 基因具有较高的同源性^[14],分别具有 84%、77%、79% 的相似性。SMART 软件预测鲤 *CYR61 A*、*CYR61 B* 和 *CYR61 C*

图7 *CYR61* 基因在各组织中的相对表达量Fig. 7 The relative expression of *CYR61* in the tissues

都含有4个保守模块:类胰岛素生长因子结合结构域(IGFBPs)、C型冯·维勒布兰德氏病结构域

(vWC)、血小板反应蛋白-1结构域(TSP1)和富含半胱氨酸的羧基端结构域(CT)。BRIGSTOCK^[15]指出CCN家族成员的翻译产物是含343~381个氨基酸残基、相对分子质量为35~40 ku的分泌蛋白,这些蛋白都含有38个保守的半胱氨酸,均包含4个保守结构域,即IB、vWC、TSP1、CT,鲤*CYR61*基因的3个复制编码的蛋白质虽长度不同,保守的功能模块却是相同的。

进化树分析表明,鲤*CYR61 A*和*CYR61 B*分别与斑马鱼*CYR61 A*和*CYR61 B*聚类,而斑马鱼和鲤*CYR61 C*则与其他物种*CYR61*基因聚类在相应的群中,表明*CYR61 C*与其他高等动物的*CYR61*同源性更高。对斑马鱼和鲤*CYR61*基因间的分歧距离和分化时间分析表明*CYR61 A*、*CYR61 B*和*CYR61 C*的分化时间早于斑马鱼和鲤的分化时间(5千万年前)^[16-17]。通过比对其他物种现有基因组序列发现*CYR61 A*、*CYR61 B*是鱼类独有的。研究还发现斑马鱼、鲤的*CYR61 A*和*CYR61 B*基因与*CYR61 C*、人和小鼠等动物*CYR61*编码的氨基酸链长度均不相同,这可能是导致鱼类*CYR61 A*和*CYR61 B*基因与*CYR61 C*及其他物种*CYR61*基因同源性差异较大的原因,推测与物种进化有关。刘春伟和孙超^[18]指出可能由于进化程度不同,导致ORL1基因在不同物种间同源性差异较大。

表5 *CYR61* 基因在各胚胎发育时期的相对表达量Tab. 5 The relative expression of *CYR61s* in the embryonic development periods.

基因	0 h	6 h	18 h	24 h	36 h	48 h	72 h	3 d	6 d
<i>CYR61 A</i>	47.119 2 ± 2.466 5	6.731 8 ± 0.433 5	1.078 1 ± 0.138 9	3.576 2 ± 0.305 4	1.425 2 ± 0.141 9	1.315 6 ± 0.147 7	2.397 3 ± 0.097 6	2.953 6 ± 0.066 5	1.315 8 ± 0.117 7
<i>CYR61 B</i>	51.430 9 ± 2.566 4	7.654 4 ± 0.324 7	4.598 3 ± 0.336 5	1.001 8 ± 0.122 6	5.463 1 ± 0.334 4	6.816 7 ± 0.538 3	7.241 9 ± 0.519 1	8.004 3 ± 0.670 7	4.573 4 ± 0.200 4
<i>CYR61 C</i>	7.294 9 ± 0.822 8	2.098 34 ± 0.185 0	1.000 8 ± 0.055 2	2.869 3 ± 0.195 6	1.844 5 ± 0.199 7	1.467 1 ± 0.114 0	3.536 9 ± 0.339 3	7.034 7 ± 0.462 4	3.252 9 ± 0.051 4

明确基因的表达规律是研究基因功能的重要手段之一。本文利用RT-PCR和实时荧光定量PCR检测了鲤*CYR61*基因在13个组织和9个胚胎发育时期的表达特点。结果表明*CYR61 A*在精巢、肠、鳃中表达较高。*CYR61 B*在精巢和脑中表达最高。*CYR61 C*在13个组织中均有表达,在卵巢、肠、脑中有较高的表达。鲤各*CYR61*基因在组织中的表达差异较大,推测鲤*CYR61*的3个复制间的功能存在差异或互补。FORCE等^[19]指

出基因复制可使复制的基因获得不同的表达模式、新的功能或变成假基因。*CYR61 A*和*CYR61 B*在精巢中表达量最高,*CYR61 C*在卵巢中表达量最高,而在脑、肠、鳃等含有丰富毛细血管的组织中*CYR61*表达也较高,推测可能与血管的生成有关。CHEN等^[4,20]指出在血管生成包括毛细血管膜的拆解、迁移,内皮细胞的增殖以及管腔的形成等复杂过程中,*CYR61*可以促进大鼠角膜血管内皮细胞的迁移和诱导新生血管生成,由于细

胞迁移是 *CYR61* 直接诱导的血管生成的唯一过程, *CYR61* 可能作用于血管新生的全过程。实时荧光定量 PCR 的分析结果显示, 鲤 *CYR61* 的 3 个复制在 0 h 表达量最高, 随后显著降低到 18 h 或 24 h, 但 *CYR61 B* 和 *CYR61 C* 在 6 h 表达水平也较高, 推测可能与受精卵细胞的增殖有关, MO 等^[21] 指出 *CYR61* 具有明显的促有丝分裂活性和趋化性, 参与调节细胞的增殖、转移和粘附, TONG 等^[22] 认为 *CYR61* 可能是一个潜在的促肿瘤形成因子, *CYR61* 的表达可能参与调控受精卵初期的发育。胚胎发育后期, *CYR61* 3 个复制的表达量均在 3 d 时升高, 推测与胚胎发育的血管生成有关。O' BRIEN 和 LAU^[23] 指出小鼠胚胎发育中 *CYR61* 在胎盘、血管和心脏等组织表达, MO 等^[21] 指出 *CYR61* 缺失可导致小鼠胎盘的血管生成减少, 胚胎失去大血管的完整性, 但进一步确定 *CYR61* 基因在鲤生长发育中的具体功能还需对更多的如 FISH(荧光原位杂交)、Northern blot、基因敲除与敲入等方法的研究。

本研究利用斑马鱼 *CYR61* 基因与鲤基因组进行 BLASTN 比对, 经过克隆测序验证得到 3 个鲤与斑马鱼相对应的 *CYR61* 基因, 分别为 *CYR61 A*、*CYR61 B* 和 *CYR61 C*。系统进化树和氨基酸序列比对分析显示鲤 *CYR61* 基因 3 个复制间及与其他物种的 *CYR61* 基因存在高度同源性, 其中鲤 *CYR61 C* 与其他物种的同源性更高, 且鲤可能含哺乳动物、两栖动物等高等动物没有的 *CYR61 A*、*CYR61 B* 拷贝。采用 RT-PCR 法和实时荧光定量 PCR 法对鲤 *CYR61* 基因的组织表达和胚胎发育时期的表达进行了分析, 推测其与血管生成及发育有关。但 *CYR61* 基因在鲤血管生成及在胚胎发育过程中的具体作用和为何出现上述表达规律还不清楚, 其在鱼类生长发育过程中的规律及不同复制间的不同功能还需要进一步研究发掘。

对实验过程中张研博士、赵紫霞博士、李炯堂博士、冀培丰、万玉美等的帮助和支持表示衷心感谢。

参考文献:

- [1] 焦园园, 杨桂文, 安利国, 等. CCN 蛋白家族研究进展 [J]. 山东师范大学学报: 自然科学版, 2005, 20(3): 77 - 79.
- [2] 苏炳银, 蔡文琴. CCN 家族研究进展 [J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(2): 179 - 183.
- [3] KIREEVA M L, MO F E, YANG G P, et al. *CYR61*, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1996, 16(4): 1326 - 1334.
- [4] CHEN C C, CHEN N, LAU L F. The angiogenic factors *CYR61* and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(13): 10443 - 10452.
- [5] BORNSTEIN P. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: An appraisal of thrombospondin 1 [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1995, 130(3): 503 - 506.
- [6] BABIC A M, CHEN C C, LAU L F. Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 19(4): 2958 - 2966.
- [7] 张春炳, 朱健. 富半胱氨酸 61 的心血管作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(7): 579 - 581.
- [8] 王志敏, 丛雅琴. *CYR61* 的表达与肿瘤的相关研究 [J]. 实用肿瘤学杂志, 2009, 23(3): 290 - 292.
- [9] 杜亚军, 司维柯, 何通川, 等. *CYR61* 在单纯及放创复合愈合过程中的表达及其临床意义 [J]. 重庆医学, 2008, 37(9): 937 - 939.
- [10] LI Wen-hsiung. *Molecular Evolution* [M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1997.
- [11] LIOR D, SHULA B, FELDMAN M W, et al. Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2003, 20(9): 1425 - 1434.
- [12] WANG A M, DOYLE M V, MARK D F. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(24): 9717 - 9721.
- [13] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C (T)) method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 - 408.
- [14] FERNANDO C A, CONRAD P A, BARTELS C F, et al. Temporal and spatial expression of CCN genes in zebrafish [J]. *Developmental Dynamics*, 2010, 239(6): 1755 - 1767.
- [15] BRIGSTOCK D R. The connective tissue growth factor/cysteine-rich61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family [J]. *Endocrine Reviews*, 1999, 20(2): 189 - 206.
- [16] DIXON B, NAGELKERKE L A J, SIBBING F A, et al. Evolution of MHC class II beta chain-encoding genes in the Lake Tana barbel species flock (*Barbus intermedius complex*) [J]. *Immunogenetics*, 1996, 44(6): 419 - 431.
- [17] STROBAND H W J, STEVENS C, KRONNIE G, et al.

- Expression of carp-cdx1, a *caudal* homolog, in embryos of the carp, *Cyprinus carpio* [J]. Roux's Archives of Developmental Biology, 1995, 204(6):369-377.
- [18] 刘春伟, 孙超. 猪 OLR1 基因克隆及生物信息学分析 [J]. 西北农业学报, 2008, 17(5): 51-55.
- [19] FORCE A, LYNCH M, PICKETT F B, et al. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations [J]. Genetics, 1999, 151(4):1531-1545.
- [20] CHEN C C, MO F E, LAU L F. The angiogenic factor *CYR61* activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(50):47329-47337.
- [21] MO F E, MUNTEAN A G, CHEN C C, et al. *CYR61* (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity [J]. Molecular and Cellular Biology, 2002, 22(24): 8709-8720.
- [22] TONG X, XIE D, O' KELLY J, et al. *CYR61*, a member of CCN family, is a tumor suppressor in non small cell lung Cancer [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(50): 47709-47714.
- [23] O' BRIEN T P, LAU L F. Expression of the growth factor-inducible immediate early gene *CYR61* correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development [J]. Cell Growth & Differentiation, 1992, 3(9):645-654.

Molecular cloning and expression and phylogenetic trees' construction of *CYR61* gene in common carp

SUN Ting^{1,2}, LIU Wei^{1,3}, XU Peng¹, SUN Xiao-wen¹

(1. The Centre for Applied Aquatic Genomics, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China; 2. College of Fishery and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. College of Aqua-Life Science and Technology, Dalian Ocean University, Dalian 116023, Liaoning, China)

Abstract: *CYR61*, CTGF and NOV constitute the CCN family. We used BLASTN program at the NCBI to identify near matches in the common carp (*Cyprinus carpio*) genome database to each zebrafish (*Danio rerio*) *CYR61*. *CYR61 A*, *CYR61 B*, and *CYR61 C* were identified respectively. ORF of the 3 duplicates of *CYR61* were cloned and sequenced in common carp. *CYR61 A* was 1 158 bp encoding polypeptides of 385 amino acids with a calculated Mw of 42.55 ku and PI of 7.83. *CYR61 B* was 1 053 bp. *CYR61 C* was 1 107 bp encoding polypeptides of 368 amino acids with a calculated Mw of 40.83 ku and PI of 8.54. *CYR61 A* and *CYR61 C* have 5 exons and 4 introns. *CYR61 A*, *CYR61 B*, and *CYR61 C* all contained 4 conservative domains in common carp. Phylogenetic relationship analysis indicated that *CYR61* genes of common carp have higher homology with other species' *CYR61* genes. Differentiation time of *CYR61 A*, *CYR61 B* and *CYR61 C* were earlier than the divergence time between common carp and zebrafish by using MEGA 5.0 software and divergence time formula analysis. RT-PCR analysis revealed *CYR61 C* to be expressed in most common carp tissues, with the principal expression in ovary and weakest expression in heart. *CYR61 A* was predominantly expressed in testicle and not detected in kidney and body kidney. *CYR61 B* was highly observed in testicle and brain. Quantitative real-time PCR were used to analyse the expression of *CYR61* in common carp development, the result indicated that *CYR61* transcriptions expressed highly at the initial stage and lowest at 18 hpf or 24 hpf and then increased before 3d, but decreased at 6 d.

Key words: common carp; *CYR61*; clone; phylogeny; RT-PCR; QRT-PCR; gene expression