

文章编号: 1674 - 5566(2015)05 - 0641 - 09

牙鲆仔鱼 *SWS1* 基因克隆及 5 个视蛋白基因的表达

陈新页, 郭 华, 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: 鱼类主要通过视蛋白来感知光强和波长。本研究首次克隆到牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 短波紫外敏感视蛋白 *SWS1* 基因全长 cDNA 序列共 1 317 bp, 包括含 1 077 bp 的开放阅读框, 编码蛋白 358 个氨基酸, 表明牙鲆仔鱼具有潜在感知紫外线的的能力。此外, qRT-PCR 显示视杆视蛋白 *RH1* 和 *SWS1* 基因表达无显著性变化; 而中波敏感视蛋白 *RH2* 和短波蓝色敏感视蛋白 *SWS2* 基因表达从孵化后第 1 天到第 13 天显著性增强; 长波敏感视蛋白 *LWS* 基因从孵化后第 1 天到第 6 天显著性增强, 而此后到第 13 天显著性降低。RNA 整体原位杂交显示, 眼睛中感蓝光的 *SWS2* 基因表达较其他视蛋白基因晚。视蛋白基因表达信号主要分布在视网膜及晶体周围, 此外还首次发现这些视蛋白基因在皮肤、鳍条、鳃和肠道等组织中表达。

研究亮点: 本研究首次调查了牙鲆视杆视蛋白 *RH1* 基因和视锥视蛋白 *LWS*、*RH2*、*SWS1*、*SWS2* 基因在仔鱼阶段的表达水平及空间分布, 并克隆得到 *SWS1* 基因全长 cDNA 序列, 首次证实了视觉视蛋白基因在眼睛外表达的事实, 推测视觉视蛋白具有其他相关功能。

关键词: 牙鲆; 仔鱼; 视杆视蛋白; 视锥视蛋白; 基因表达

中图分类号: Q 785; S 917

文献标志码: A

视蛋白 (Opsin), 属于 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptor) 超家族中的一支。它通过一系列反应将光信号放大并通过一系列信号传导途径将信息传至大脑。对于脊椎动物而言, 这类蛋白主要由视觉细胞产生, 并且根据其是否参与直接感光成像可分为视觉系统视蛋白和非视觉系统视蛋白^[1]。脊椎动物视网膜上存在两种感光细胞: 视锥细胞和视杆细胞, 它们介导视觉光反应。视杆细胞中的视蛋白称为视杆视蛋白或视紫红质 (Rhodopsin, RH1), 与暗视觉相关; 而视锥细胞中则有视锥视蛋白, 与明视觉相关。按照吸收光谱的范围可分为长波敏感视蛋白 (long-wave sensitive opsin, LWS), 中波敏感视蛋白 (middle-wave sensitive opsin or Rhodopsin-like pigments, MWS/RH2) 和短波敏感视蛋白 (short-wave sensitive opsin, SWS)^[1]。而对于并不介导视觉光反应的非视觉视蛋白则有很多类, 包括

pinopsin、VA-opsin (vertebrate ancient opsin)、parapinopsin、exo-rhodopsin、encephalopsin、neuropsin (Opn5)、melanopsin 和 peropsin^[1-2]。

鱼类拥有多种对不同光波敏感的视锥视蛋白。2003 年, CHINEN 等最早克隆出斑马鱼 (*Danio rerio*) 5 种视觉视蛋白基因 (*RH1*、*RH2*、*LWS*、*SWS1*、*SWS2*), 发现这些视蛋白基因主要在视网膜感光细胞层中表达^[2]。此后, KAWAMURA 在青鳉 (*Oryzias latipes*) 中也克隆出视蛋白基因^[3]。其他硬骨鱼, 比如虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、银大麻哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*)、欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*)、绿背菱鲽 (*Rhombosolea tapirina*)^[4]、大西洋鲱 (*Clupea harengus*)^[5]、河鲈 (*Perca fluviatilis*)^[6] 等视蛋白基因也相继被克隆^[7], 并证实这些视蛋白均具有相似的七次跨膜结构^[8], 序列保守性强^[9]。在银大麻哈鱼和欧洲鳗鲡中尚未发现紫外敏感视蛋

收稿日期: 2015-03-13 修回日期: 2015-05-18

基金项目: 国家自然科学基金(31472262, 31072201)

作者简介: 陈新页(1990—), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类发育生物学。E-mail: chenxinye10723@126.com

通信作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

白基因 *SWS1*^[10],前者视觉主要依赖视紫红质的变化^[11],而后者则是发生了视蛋白吸收波长的迁移^[12]。在香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 中则发现两种紫外视蛋白 *SWS1-1*、*SWS1-2* 和两种绿色视蛋白 *RH2-1*、*RH2-2* 基因来适应光线变化,它们和其他视锥视蛋白基因的序列相似性均超过 75%^[13]。除眼睛外,在大西洋庸鲷 (*Hippoglossus hippoglossus*) 胚胎脑部松果体的感光器官中, FORSELL 等通过 RNA 切片原位杂交发现类似 *RH2* 和 *SWS1* 基因的松果体视蛋白基因表达^[14]。在大西洋牙鲆 (*Pseudopleuronectes americanus*) 卵黄囊期仔鱼,4 种不同的视锥视蛋白基因 (*LWS*、*RH2*、*SWS1*、*SWS2*) 开始表达^[15]。牙鲆同大部分脊椎动物一样具有 5 种感光的视觉视蛋白^[15],但目前对于牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 仔鱼阶段的视觉视蛋白基因表达情况尚无系统的研究,本研究克隆了牙鲆紫外敏感视蛋白 *SWS1* 基因 cDNA 全长序列,并调查了视觉系统视蛋白基因在仔鱼阶段的表达情况。

1 材料与方法

1.1 实验材料

牙鲆受精卵来自山东海阳市黄海水产有限公司,经 72 h 孵化后仔鱼出膜,仔鱼饲养水温 (16 ± 2) °C^[16]。所取样品一部分用液氮速冻后存于 -80 °C 备抽提牙鲆总 RNA,另一部分用 4% 多聚甲醛溶液固定 12 h 后换成甲醇保存于 4 °C 以备 RNA 整体原位杂交实验用。

1.2 牙鲆总 RNA 的提取与 cDNA 第一链的合成

采用 Trizol 法提取总 RNA。RNA 的浓度及纯度分别采用 Nanodrop 2000 超微量分光光度计和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均为 1.90~2.05,电泳显示 RNA 完整性良好。利用 M-MLV 反转录酶 (Promega 公司) 试剂盒合成牙鲆 cDNA 第一条链, -20 °C 保存备用。合成的 cDNA 第一条链,利用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司) 合成 RACE-ready-cDNA。

1.3 短波敏感视蛋白 *SWS1* 的全长 cDNA 的克隆

根据 GenBank 中人 (*Homo. sapiens*, ADQ38361.1)、斑马鱼 (*D. rerio*, NP571394.1)、

大西洋庸鲷 (*H. hippoglossus*, AAM17917.1) 等 *SWS1* 氨基酸序列及牙鲆密码子偏好性,设计上下游引物 (表 1),引物浓度为 10 μmol/L。以牙鲆 cDNA 为模板,进行常规 PCR 扩增,反应程序为:95 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 30 s,35 个循环。DNA 产物经回收并测序后,得到 276 bp 的片段序列。

测得的片段序列经 NCBI 网站比对后,根据此序列设计 RACE 引物 (表 1),引物浓度为 10 μmol/L。按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司) 说明书分别以 5'/3'-RACE-Ready cDNA 为模板,以通用引物 UPM 和 5'/3' 特异引物分别进行 5' RACE 和 3' RACE 的扩增反应,程序均为:94 °C 30 s,72 °C 3 min,5 个循环;94 °C 30 s,70 °C 30 s,72 °C 3 min,5 个循环;94 °C 30 s,68 °C 30 s,72 °C 3 min,25 个循环;PCR 产物用 1% 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 片段后连接到 pGEM-T 载体 (Promega 公司) 上,转化至大肠杆菌 Top10 感受态细胞中,挑选阳性克隆鉴定后送至生物工程 (上海) 有限公司测序。

1.4 序列分析

由测序结果得到 *SWS1* 基因的 3' 和 5' 末端 cDNA 序列。使用 ContigExpress 软件进行序列拼接,获得牙鲆 *SWS1* 全长 cDNA 序列;通过 DNASTAR 软件预测和翻译该序列开放阅读框;利用美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 分析序列的结构域和同源性;运用 EXPASY (<http://www.expasy.ch>) 分析牙鲆 *SWS1* 氨基酸组成、分子量、等电点和结构域等;采用 CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk>) 进行蛋白序列比对;利用 MEGA 6.0 中邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统进化树,并应用泊松分布验证进化距离。

1.5 实时荧光定量 PCR

以 β -actin 作为内参基因 (引物见表 1),实验设计 3 个重复。总体系为 20 μL:上下游引物各 0.5 μL (引物浓度均为 10 μmol/L),iQTM SYBR Green Supermix 10 μL,cDNA 1 μL,RNase free H₂O 8.5 μL 补足至 20 μL。RT-qPCR 的反应条件如下:95 °C 3 min;95 °C 10 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,40 个循环;选用 CFX-96 软件 (Bio-Rad 公司) 进行熔解曲线分析和 C_t 值分析,相对表达量

计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法,其数值用平均值 \pm 标准误 (mean \pm 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时期基因表达量差异,当 $P < 0.05$ 时,表示差异显著。

表 1 PCR 扩增所用引物序列及用途

Tab.1 Nucleotide sequences and usage of oligonucleotide primers

基因	上游序列 (5'-3')	下游序列 (5'-3')	用途
<i>RH1</i>	ATGAACGGCACAGAGGGACCATATT	CATCGTTGTGGTGAATCCTCCAAA	原位杂交
<i>RH2</i>	CAGAACAAGAACTCAGGCAACCTCT	CGAAGAAGTGGACGACAAACATGTAG	原位杂交
<i>SWS1</i>	CGAACTTGAAGGAGCCGAAAGGTT	TCGTCCTGTTCCGTGACCATGAAGTATA	原位杂交
<i>SWS2</i>	GCTGCGTATTACCTGGGTGTTGCACTT	GGCATAGTAGCCAATCTCAG	原位杂交
<i>LWS</i>	CAAGAACTCCGTCACCCACTGAACTGG	TGTACCTGCTCCAGCCAAGGATTGGGGGA	原位杂交
<i>β-actin</i>	GGAAATCCTGCGTGACATTAAG	CCTCTGGACAACGGAACCTCT	qRT-PCR
<i>RH1</i>	GGAGTCTTATGAATACCTCAGTACTAC	AGGTTGAGAAGGATGTAGTTAGAGGGGTTT	qRT-PCR
<i>RH2</i>	TCATCATGTGCTGCTTCGGATTACCATCA	AGACGACGATGTATCTCTCAACAGCCAGG	qRT-PCR
<i>SWS1</i>	GAAAGGTTTACAAATGACCAGGTATCTT	TTGTCTCCACCATGAAGGGTTACTA	qRT-PCR
<i>SWS2</i>	ACCTGGGTGTTTGCACCTTATTGCCTCAG	GCAGAAGCAGAAGAGGAACATCAG	qRT-PCR
<i>LWS</i>	CTTGGTCAATCTTGAATCGCTGATCTTG	ACAGTATAGCCCTCAAAGACGCACATTGG	qRT-PCR
<i>SWS1</i>	CGTGACCAGACCTGCTATCGAGCCATGGCAG	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5' RACE
<i>SWS1</i>	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	TTGCTGACCATGAAGTATAAGAAGCTCCGACTC	3' RACE

1.6 视蛋白 mRNA 探针的制备与整体原位杂交

根据 NCBI 中已知或本研究克隆出的 5 种牙鲆视蛋白基因序列,设计各自上游和下游引物(表 1),分别进行目的基因片段克隆。测序结果比对正确后,将含有此基因片段的质粒抽提并用限制性内切酶 *Not I* 和 *Nco I* (Fermentas 公司)单酶切线性化,经纯化后分别使用 T7 和 SP6 RNA Polymerase (Promega 公司)体外合成含地高辛标记 (Roche 公司)的正义和反义 RNA 探针(37 $^{\circ}$ C, 2 h)。其反应体系如下(20 μ L):线性化质粒 DNA 1 μ g, 4 μ L 5 \times Transcription buffer, 2 μ L DTT (100 mmol/L), 0.5 μ L Rnase inhibitor (40 U/ μ L), 2 μ L 10 \times DIG Mix, 1 μ L SP6 或 T7 RNA Polymerase,用 RNase free 水补足至 20 μ L。合成好的 RNA 探针用 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计分别进行条带大小和探针浓度的检测及记录后保存于 -20 $^{\circ}$ C 中。

牙鲆仔鱼处理详细步骤参考文献[17]。经甲醇保存的牙鲆仔鱼经梯度复水至 PBST (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na_2HPO_4 , 2 mmol/L KH_2PO_4 , 调节 pH 至 7.4, 加入 0.1% Tween20)、100 mmol/L 甘氨酸漂洗去除醛基,3% 双氧水强光照脱色后,经盐酸处理后蛋白酶 K 消化,然后置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 1 h,以保持仔鱼的完整性。PBST 漂洗两次后,预杂交 4 h 以封闭非特异性位点,加入探针(1 ng/ μ L)后于 60 $^{\circ}$ C 下再杂交 16 h。杂交完毕后,

用稀释的杂交液梯度清洗,样品在抗体稀释液中 37 $^{\circ}$ C 震荡 1 h,然后以 1:2 000 加入地高辛抗体 (Roche 公司)过夜。用 PBST 清洗 10 h 后,在 Fast Red (Roche 公司)显色液中室温避光显色 1~2 h。

1.7 显微观察和图像处理

RNA 原位杂交处理的仔鱼样品用 SMZ 1500 体视显微镜 (尼康公司)观察和拍摄。然后此样品再被冰冻切片成 8 μ m 厚于载玻片上,在 SZX 7 显微镜 (奥林帕斯公司)下观察和拍照,图片经 Adobe Photoshop 6.0 软件编辑。

2 结果

2.1 牙鲆 *SWS1* 基因 cDNA 全长序列分析

牙鲆 *SWS1* 基因全长为 1 317 bp,其 5' UTR 和 3' UTR 分别为 109 bp 和 131 bp,包括 1 077 bp 的 ORF 编码 358 个氨基酸,蛋白分子量约为 48.9 ku,等电点为 7.45。该蛋白包含一个 Rhodopsin_N 结构域和一个 7tm_1 (7 transmembrane receptor)结构域(图 1)。

牙鲆 *SWS1* 基因序列与条斑星鲽 (*Verasper moseri*)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 等鲽形目鱼类基因核苷酸序列相似性分别为 98.5% 和 96.7%,表明 *SWS1* 基因保守性强。基于氨基酸序列的系统进化分析表明,牙鲆的短波敏感视蛋白 *SWS1* 先和条斑星鲽的 *SWS1* 聚为一支,两者聚合后再与大菱鲆 *SWS1* 聚为一支,然后与所有物

种的 *SWS1* 聚集一起后,再与牙鲆的长波敏感视 蛋白 *LWS* 聚集(图 2)。

```

1   ggtagaacagcttcagttgggatcacaggtctctagggatcctttgggcaaaaaagaaaacagagaagcatcttctctatacaa
   gaaaggactttatagagctgctacc
110  ATGGCAGGAGCGTGGGAAAACAGGTGTTTGTGCAGGCGGTACCATGAAGATACCATGATGGGAAA CACTTCCACCTGTATGAGAAC
   M A G A W G K Q V F A A R R Y H E D T M M G K H F H L Y E N
201  GTTTCATATGTGAGTCCCTTCGATGGGCCACAGTATTACCTGGCACCTCAATGGGCTTTTCACCTGCAAACGATCTTCATGGGCTCCGTC
   V S N V P F D G P Q Y Y Q W A E H L Q T I F M G S V
291  CTGTTCGCTGGCACTCCCTTTAACTTTATTGTTCTTCTTGACACTCAAGTACAA GAAGC TCAGAGTCCCTCTCAATTACATCCCTCGTC
   L F A G T P L N F I V L L V T L K Y K K L R V P L N Y I L V
381  AACATCTGCTTCGACAGGATTAATCTTTGTGGTCTTCTCAGTAGAGCCAGGTGT TGTCTCCA CCATGAGGGGTTA CTCTTCC TGGGTCCC
   N I C F A G L I F V V F S V S Q V F V S T M R G Y F F L G P
471  ACACGTGTGCACCTGGAATCTGCCATGGGCTCGATAGCAGGTCTGGTCACTCGTGGTCTT TGGC CGTT CTCTCTTTGGAAGATACCTG
   T L C A L E S A M G S I A G L V T S W S L A V L S L E R Y L
561  GTCATTTGTAAACCATTCGGAGCCTTTAGGTTTGGCAGTAATCACGCCGCAGGCGC TGTCG CCTT CACC TGGTT CATGGGGA TCAGCTGT
   V I C K P F G A F R F G S N H A A G A V A F T W F M G I S C
651  GCCATACCACCTTTCTTTGGATGGAGCAGGTACATCCCTGAAGTCTGGGTTGCTC GTGTGTCCTGAT TGGTA CACGCACA ACGAGGAG
   A I P P F F G W S R Y I P E G L G C S C G P D W Y T H N E E
741  TTTCAGTGCAGCAGCTACACAACTTCTTGATGGT GACGTGCTTCATCTTCGCT CACCA TCAT CATC TTCTCTACACCC AGTTACTG
   F H C S S Y T N F L N V T C F I L P L T I I I F S Y T Q L L
831  AGTTCCTGTAGAGCGGTTGCGGCTCAGCAGACGGAGTCACTGCTCGACT CAGAAGGC CGAGA AGGAAGTA TCGAGGATGATTA TCGTGATG
   S S L R A V A A Q Q T E S V S T Q K A E K E V S R M I I V M
921  GTCGGTCCCTTCGTCACCTTGTACGGTCCA TATGCTCTCGCCGCTCTT TACTTCGCTCACTCTTCAGACACAAA CAAAGACTATCGACTC
   V G S F V T C Y G P Y A L A A L Y F A H S S D T N K D Y R L
1011  GTCACCATCCCGGCATT TTTCTCCAA GAGCTCTTGTGTC TACAACCCGTTAA TCTACGCTCTCAT GAACAACA GTTTAAAG CCTGTATC
   V T I P A F F S K S S C V Y N P L I Y V F M N K Q F K A C I
1101  ATGGAAACAGTGT TTGAAAGA AAATGGAC GAATCATCT GAAGTTTCT TCAA AAAC TGAGGCATCTTCAGTTTC CACAGTTAATTA
   M E T V F G K K M D E S S E V S S K T E A S S V S T V N *
1188  tttgaacaaattaagaagtgatgcccggatgaaaaagattataagctacatttttgt caaat acaagcaaaactgt tcat ttaa ctgtagaa
   ttttttagataaaataaaaaataaatgt tatat aact aaaa aaaaa aaaaa aaaaa aaaaa

```

图 1 牙鲆 *SWS1* 基因 cDNA 全长序列及由此预测的氨基酸序列

Fig. 1 Full-length cDNA sequence and putative amino acid sequence of *P. olivaceus SWS1* gene

上面为核苷酸序列,下面为氨基酸序列;小写字母表示为 5' UTR 和 3' UTR; * 代表终止密码子。Rhodopsin_N 结构域用阴影部分表示;7tm_1 结构域用粗线方框表示。

Deduced amino acid sequence for the open reading frame shown in the figure; Both 5' UTR and 3' UTR indicated by lower case letter;

* indicates termination codon; Rhodopsin_N: Amino terminal of the G-protein receptor rhodopsin; 7tm_1: 7 transmembrane receptor (rhodopsin family).

2.2 牙鲆仔鱼视蛋白基因表达水平的变化

通过 qRT-PCR 分析牙鲆 5 种视蛋白基因的总表达情况(图 3),发现 *RH1* 和 *SWS1* 基因从孵化后第 1 天到第 13 天表达量未发生显著性变化(图 3-a, d);而 *RH2* 和 *SWS2* 基因表达量从第 1 天到 13 天显著性增强(图 3-b, e);*LWS* 基因则从孵化后第 1 天到第 6 天相对表达量显著性增强,然后到第 9 天、第 13 天显著性降低(图 3-c)。

2.3 牙鲆仔鱼视蛋白基因在不同发育阶段表达

牙鲆仔鱼视蛋白基因整体空间表达如图版 I 所示。*RH1*(图版 I - A1)和 *SWS1* 基因(图版 I - D1)在牙鲆初孵仔鱼(DAH1)孵出后就有较

强表达;*RH2*、*LWS*、*SWS2* 基因在卵黄囊与鳍条等处有表达(图版 I - B1, C1, E1);在卵黄囊开始缩小的 DAH3,除 *SWS2* 基因外,可见其他视蛋白基因在仔鱼广泛表达(图版 I - E2);*SWS2* 基因直到 DAH6 才开始在鳍条处表达(图版 I - E3)。同为短波敏感视蛋白的 *SWS1* 基因始终可见表达(图版 I - D1 ~ D5)。从 DAH9 后,5 种视蛋白基因在牙鲆仔鱼表达位置主要集中于鳍褶(图版 I - 8)、鳍条(图版 I - 2, 7)、鳃(图版 I - 4)、上下颌(图版 I - 10)、冠状幼鳍(图版 I - 12)、肌节(图版 I - 6)、鼻(图版 I - 5)、肠(图版 I - 3)、脊索(图版 I - 11)等处。



图 2 牙鲆视锥视蛋白 SWS1 氨基酸序列系统进化树

Fig. 2 A phylogenetic tree constructed by the Neighbour-Joining method for amino acid sequences of SWS1

条斑星鲽 *Verasper moseri* SWS1 (BA_O93915.1); 大鳞盲豆娘鱼 *Parma oligolepis* SWS1 (AE_O00696.1); 白身臂灯鱼 *Stenobranchius leucopsarus* SWS1 (AC_J72020.1); 大菱鲆 *Scophthalmus maximus* SWS1 (AA_Q02801.1); 瓜子鲷 *Girella punctata* SWS1 (BA_D80827.2); 慈鲷鱼 *Coptodon bakossiorum* SWS1 (AD_K92832.1); 黑带椒雀鲷 *Plectrogly dickii* SWS1 (AE_O00697.1); 迈卡丽鱼 *Myaka myaka* SWS1 (AD_K92820.1); 喀麦隆康尼丽鱼 *Konia dikume* SWS1 (AD_K92821.1); 马拉维湖慈鲷 *Tramitichromis intermedius* SWS1 (AD_A77667.1); 巨鲷鱼 *Labidochromis gigas* SWS1 (AD_J54159.1); 希萨鲷鱼 *Labidochromis chisumulae* SWS1 (AD_J54155.1); 埃氏康尼丽鱼 *Konia eisentrauti* SWS1 (AD_K92822.1); 牙鲆 *Paralicthys olivaceus* RH1 (AD_Q38361.1); 牙鲆 *Paralicthys olivaceus* RH2 (AD_I59659.1); 牙鲆 *Paralicthys olivaceus* SWS2 (AD_I59658.1); 牙鲆 *Paralicthys olivaceus* LWS (AD_I59657.1)。

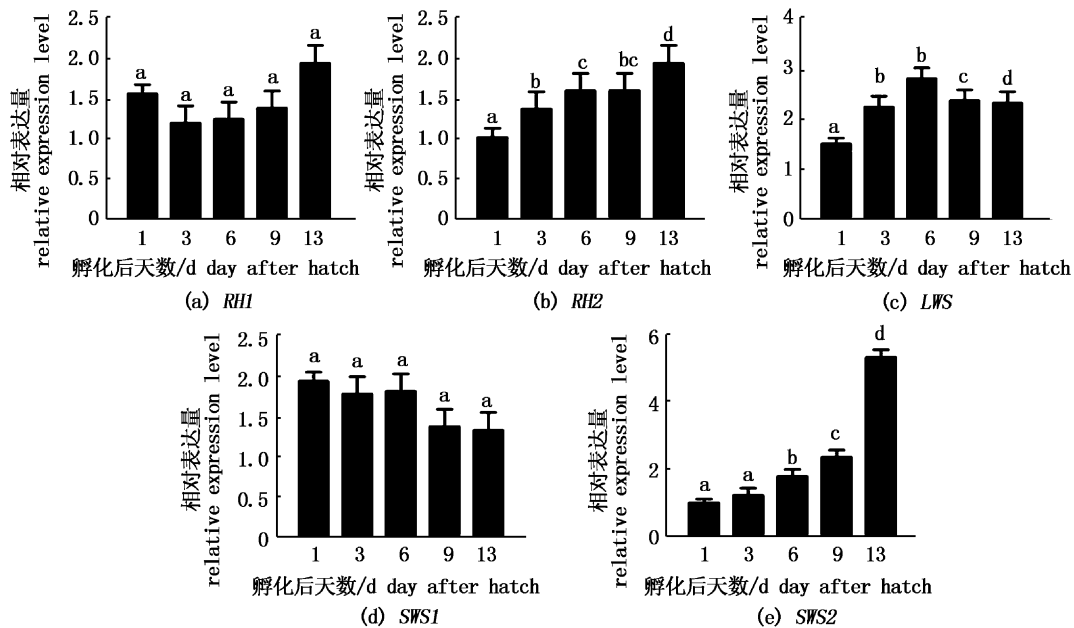


图 3 牙鲆仔鱼视蛋白基因的相对表达量

Fig. 3 Gene expressional level of five opsin genes in larval *P. olivaceus* by qRT-PCR

字母标注相同的,表示组间没有显著性差异。

The same letters indicate no significant differences between groups.

2.4 牙鲆仔鱼眼睛中视蛋白基因表达分布

视杆视蛋白 *RHI* 基因及 4 种视锥视蛋白 (*RH2*、*LWS*、*SWS1*、*SWS2*) 基因在眼睛中的表达见图版 II。牙鲆孵出后第 1 天 (DAH1), 视杆视蛋白 *RHI* (图版 II - A1 - 1, A1 - 2) 基因表达时间最早, 其表达范围也相对较大; 视锥视蛋白基因中, 短波敏感视蛋白 *SWS* 基因则有着不同的表达情况: 其中 *SWS1* 基因 (图版 II - C1 - 1, C1 - 2) 表达明显早于 *SWS2* (图版 II - D1 - 1, D1 - 2); 而在中长光谱波段, *RH2* (图版 II - B1 - 1, B1 - 2) 与 *LWS* 基因在初孵仔鱼两眼外侧的视网膜感光细胞层表达 (图版 II - E1 - 1, E1 - 2; 图版 II - 3); 此时, 除暂未表达的 *SWS2* 基因外, 其余的视蛋白基因主要集中在眼睛朝向鼻翼侧的视网膜感光细胞层表达 (图版 II - 1)。在孵出后第 3 天仔鱼的眼睛中, 仍未见 *SWS2* 基因表达 (图版 II - D2 - 1, D2 - 2), 其他视蛋白基因表达范围扩大, 表达强度也逐渐增强。冰冻切片可见 *SWS1*、*LWS* 基因视网膜中视蛋白基因信号表达范围扩大, 沿着鼻侧向颞侧发展 (图版 II - 5, 6, 7); *SWS2* 基因在 DAH6 仔鱼的眼睛中隐约可见 (图版 II - D3 - 1, D3 - 2), *SWS1* 基因仍有较强表达 (图版 II - C3 - 1, C3 - 2)。到 DAH9 时, 牙鲆仔鱼眼部视蛋白基因环绕仔鱼眼睛周围表达, *SWS2* 基因表达范围也逐渐增大 (图版 II - D4 - 1, D4 - 2); 5 种感光视蛋白基因在 DAH13 仔鱼的眼睛中均有一定程度的表达, 此时冰冻切片显示 *RHI* 表达信号环绕整个视网膜感光细胞层 (图版 II - 9)。

3 讨论

本研究首次克隆了牙鲆短波敏感视蛋白 *SWS1* 基因全长 1 317 bp 的 cDNA 序列, 发现其编码的蛋白包含 2 个视蛋白基因家族特有结构域, 分别是 Rhodopsin_N (视紫红质 N 端 G 蛋白受体) 区和一个 7tm_1 区 (七次跨膜受体区)。系统进化分析显示牙鲆先与其他鱼类的 *SWS1* 基因聚在一支, 然后再跟其他视蛋白基因聚在一起, 表明本研究所克隆到的序列为 *SWS1* 基因序列。目前, 已在斑马鱼^[2]、香鱼^[13]、大西洋庸鲽^[14] 等鱼类中发现了该基因。已报道的两栖类和鱼类等已测定的 21 种脊椎动物的 *SWS1* 的 λ_{\max} 均为 360 nm 左右^[18]。在牙鲆中发现 *SWS1* 基因, 表明牙鲆具有潜在的感受紫外光线的的能力。

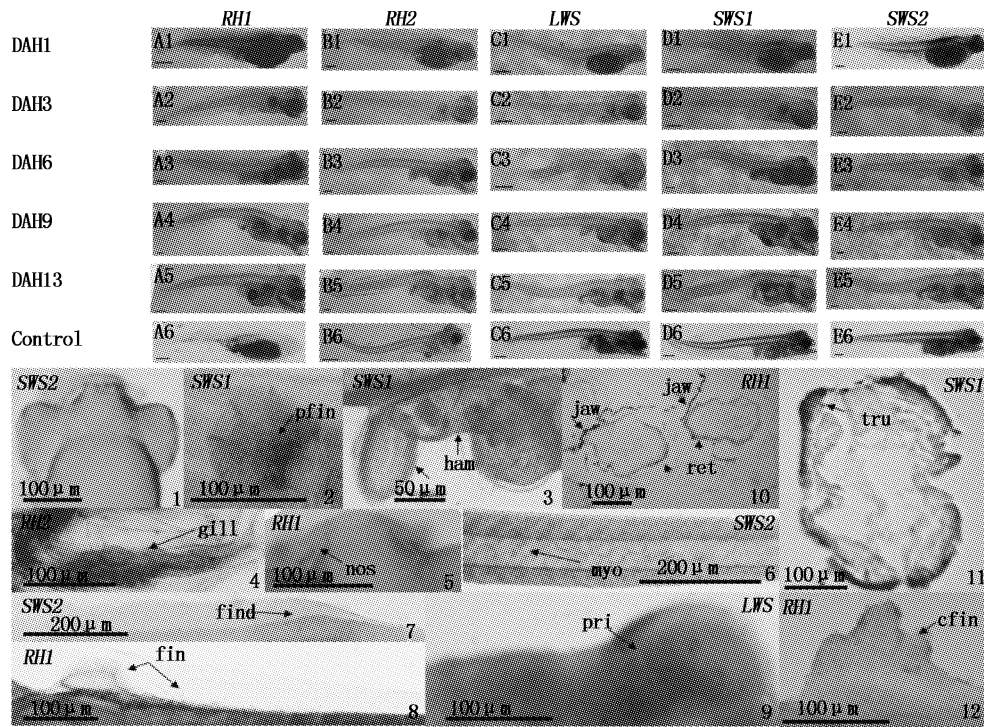
从孵化后第 1 天到第 13 天, *RHI* 基因在眼睛中总体表达较强, 该结果与 qRT-PCR 得到的结果相吻合, 表明牙鲆仔鱼 *RHI* 基因相对表达量的变化与眼睛中表达的变化趋势一致。随着眼睛的发育, *RHI* 基因在视网膜感光层中的表达范围逐渐扩大, 从鼻翼侧逐渐延伸至整个视网膜。*RHI* 在 0 ~ 10 m 水层的鱼类中 λ_{\max} 接近 500 nm^[19], 由于 *RHI* 本身 λ_{\max} 为 493 nm, 所以牙鲆仔鱼视杆视蛋白 *RHI* 可直接对此光波长接收^[19]。同时, 视锥蛋白 *RH2* 的感受范围也在 510 nm 左右, 因此牙鲆仔鱼的视锥蛋白 *RH2* 与 *RHI* 基因表达有相似的表现, 这种相似的表现也在金眼鲷目金鳞鱼科中被发现^[19]。

LWS 主要感受长波的红色光 (λ_{\max} 为 560 nm), 普遍在有胎盘哺乳动物及两栖类视网膜中表达^[20]。*SWS1* 的吸收波长 λ_{\max} 为 360 nm 左右^[18]。在牙鲆初孵仔鱼中感受长波长和短波长的 *LWS* 和 *SWS1* 基因就有表达, 表明一开始牙鲆仔鱼就具有感受长波长和短波长光线的的能力, 可能有助于尽早地避开紫外线对鱼体的伤害。令人奇怪的是, 相比另外 4 种在第 1 天就表达的感光视蛋白基因, 同样感受短波蓝光的 *SWS2* 的基因直到孵化后第 6 天才开始表达, 这点与同为比目鱼的大西洋牙鲆就有一定的差异^[15]。除了环境对此造成的原因, 究其本质, 在调查了其他物种视蛋白基因表达的先后顺序后, 我们发现这种情况也在大马哈鱼等视网膜中出现, 出现这种情况的原因可能是相对于哺乳类等高等脊椎动物, 鱼类的视蛋白基因序列相似性相对较低, 并由于长期生活在海洋不同水深, 发生“蓝移”、“红移”的概率也大得多^[21]。在此之前, 仔鱼可能通过 *SWS1* 感受蓝光, 因为 *SWS1* 除了感受紫外以外, 也能感受 λ_{\max} 390 ~ 440 nm 的蓝光^[22], 对视蛋白基因序列的比较发现得到感受较早, 这点在鱼类中普遍存在。有研究表明, 仅仅一个氨基酸的替换就可以使 *SWS1* 的敏感性向蓝色转换^[19]。

本研究还首次发现了视杆视蛋白和视锥视蛋白基因在牙鲆仔鱼阶段眼睛以外的组织中广泛表达, 如鳍条、上下颌、鼻、鳃、肌节、表皮层及肠等组织, 尤其在表皮大范围地表达, 说明了表皮也具有感光能力。在非视觉系统视蛋白, 如体表的黑视蛋白与光行为、褪黑激素的合成、睡眠等密切相关, 脑中的松果体视蛋白, 可能参与节

律的变化及生物钟的调控等^[22]。同属视蛋白的牙鲆视杆和视锥视蛋白,可能并不是以往所认为

的单一介导视觉的功能,而可能具有多种未知的作用,有待今后进一步地深入调查。

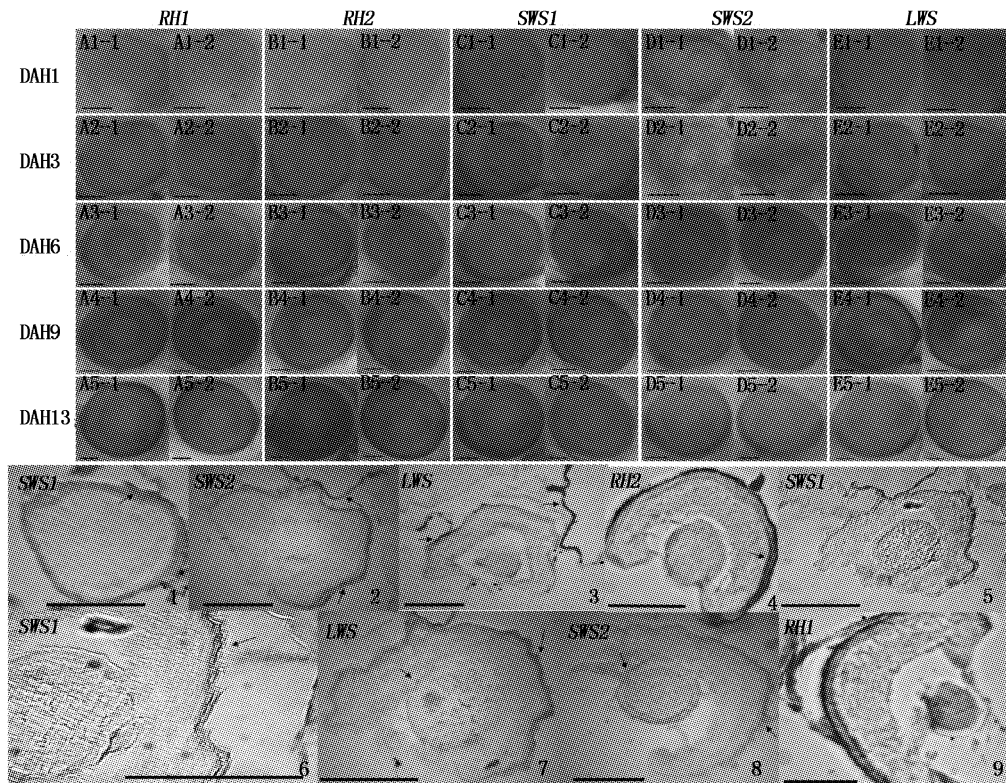


图版 I 牙鲆仔鱼阶段视蛋白基因的整体表达

Plate I Expressional pattern of opsin genes in larval *P. olivaceus*

A ~ E. *RHI*、*RH2*、*SWS1*、*SWS2*、*LWS* 基因在牙鲆仔鱼时期的全身表达模式及阴性对照;红色为基因表达信号,黑色箭头所指为信号较强处。1. *SWS2* 背面观(DAH9); 2. *SWS1* 胸鳍(DAH9); 3. *RH2* 肠道(DAH13); 4. *RH2* 鳃(DAH9); 5. *RHI* 鼻(DAH9); 6. *SWS2* 肌节(DAH3); 7. *SWS2* 鳍褶(DAH1); 8. *RHI* 鳍条(DAH6); 9. *LWS* 冠状幼鳍原基(DAH6); 10. *RHI* 冠状幼鳍(DAH13); 11. *RHI* 眼睛的横切(DAH6); 12. *SWS1* 身体的横切(DAH13); pfin. 胸鳍; ham. 肠; jaw. 颌; ret. 视网膜; tru. 脊索; gill. 鳃; nos. 鼻子; myo. 肌节; find. 鳍褶; fin. 鳍条; pri. 原基; cfin. 冠状幼鳍; 标尺为 200 μm 。

A - E. Expression patterns and the negative control of *RHI*, *RH2*, *SWS1*, *SWS2* and *LWS* gene in larval *P. Olivaceus*. Hybridization signals were reflected as red color. Black arrow shows strong signals. 1. Dorsal view of *SWS2* gene (DAH9); 2. Expressing pattern of pectoral fin of *SWS1* gene (DAH9); 3. Expressing pattern of intestine of *RHI* gene (DAH6); 4. Expressing pattern of gill of *RH2* gene; 5. Expressing pattern of nose of *RHI* gene (DAH9); 6. Expressing pattern of myocoma of *SWS2* (DAH3); 7. Expressing pattern of fin fold of *SWS2* gene (DAH9); 8. Expressing pattern of fin of *RHI* gene; 9. Expressing pattern of the primordium of coronary fin of *LWS* gene (DAH6); 10. Expressing pattern of coronary fin of *RHI* gene (DAH13); 11. Expressing pattern of the crosscut on both eyes of *RHI* gene (DAH6); 12. Expressing pattern of the crosscut on body of *SWS1* gene (DAH13); pfin. pectoral fin; int. intestinal; jaw. jaw; ret. retinal; not. notochord; gill. gill; nos. nose; myo. myocoma; find. fin fold; fin. fin; pri. primordium; cfin. coronary fin. Bars, 200 μm .



图版 II 牙鲆仔鱼眼睛中视蛋白基因的表达分布

Plate II Expressional pattern of five opsin genes in eyes of larval *P. olivaceus*

A ~ E. *RH1*, *RH2*, *SWS1*, *SWS2*, *LWS* 基因在牙鲆仔鱼各时期眼睛中的表达情况。红色处为基因表达信号, 黑色箭头所指为信号较强处。1. *SWS1* (DAH1); 2. *SWS2* (DAH9); 3. *LWS* (DAH9); 4. *RH2* (DAH13); 5. *SWS1* (DAH3); 6. *SWS1* 信号放大图 (DAH3); 7. *LWS* (DAH3); 8. *SWS2* (DAH13); 9. *RH1* (DAH13); 所有标尺为 100 μm 。

A ~ E. Expression patterns of *RH1*, *RH2*, *SWS1*, *SWS2* and *LWS* gene in eyes of larval *P. Olivaceus*. Hybridization signals were reflected as red color. Black arrow shows strong signals. 1. *SWS1* (DAH1); 2. *SWS2* (DAH9); 3. *LWS* (DAH9); 4. *RH2* (DAH13); 5. *SWS1* (DAH3); 6. Signal amplification of *SWS1* (DAH3); 7. *LWS* (DAH3); 8. *SWS2* (DAH13); 9. *RH1* (DAH13); All Bars, 100 μm .

参考文献:

- [1] YOKOYAMA S. Molecular evolution of vertebrate visual pigments [J]. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2000, 19(4): 385 - 419.
- [2] CHINEN A, HAMAOKA T, YAMADA Y, et al. Gene duplication and spectral diversification of cone visual pigments of zebrafish [J]. *Genetics*, 2003, 163(2): 663 - 675.
- [3] KAWAMURA S, TAKESHITA K, TSUJIMURA T. Evolutionarily conserved and divergent regulatory sequences in the fish rod opsin promoter [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 141(4): 391 - 399.
- [4] AHLBERT I B. Ontogeny of double cones in the retina of perch fry (*Perca fluviatilis*, Teleostei) [J]. *Acta Zoologica*, 1973, 54(4): 241 - 254.
- [5] PANKHURST P M, BUTLER P. Development of the sensory organs in the greenback flounder, *Rhombosolea tapirina* [J]. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 1996, 28(1/2): 55 - 73.
- [6] BLAXTER J H S, JONES M P. The development of the retina and retinomotor responses in the herring [J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1967, 47(3): 677 - 697.
- [7] STELL W T, HÁROSI F I. Cone structure and visual pigment content in the retina of the goldfish [J]. *Vision Research*, 1976, 16(6): 647 - 657.
- [8] DOWNING J E G, DJAMGOZ M B A, BOWMAKER J K. Photoreceptors of a cyprinid fish, the roach: morphological and spectral characteristics [J]. *Journal of Comparative Physiology A*, 1986, 159(6): 859 - 868.
- [9] BOWMAKER J K, KUNZ Y W. Ultraviolet receptors, tetrachromatic colour vision and retinal mosaics in the brown trout (*Salmo trutta*): age-dependent changes [J]. *Vision Research*, 1987, 27(12): 2101 - 2108.
- [10] ALEXANDER G, SWEETING R, MCKEOWN B. The shift in visual pigment dominance in the retinæ of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): an indicator of smolt status [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1994, 195(1): 185 - 197.

- [11] BROWMAN H I, HAWRYSHYN C W. Thyroxine induces a precocious loss of ultraviolet photosensitivity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Teleostei) [J]. *Vision Research*, 1992, 32(12): 2303–2312.
- [12] ARCHER S, HOPE A, PARTRIDGE J C. The molecular basis for the green-blue sensitivity shift in the rod visual pigments of the European Eel[J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 1995, 262(1365): 289–295.
- [13] MINAMOTO T, SHIMIZU I. Molecular cloning and characterization of rhodopsin in a teleost (*Plecoglossus altivelis*, Osmeridae) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 134(4): 559–570.
- [14] FORSELL J, HOLMQVIST B, EKSTRÖM P. Molecular identification and developmental expression of UV and green opsin mRNAs in the pineal organ of the Atlantic halibut[J]. *Developmental Brain Research*, 2002, 136(1): 51–62.
- [15] HELVIK J V, DRIVENES Ø, HARBOE T, et al. Topography of different photoreceptor cell types in the larval retina of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2001, 204(14): 2553–2559.
- [16] 李慧, 徐义平, 鲍宝龙. 牙鲆胚后发育阶段 *HDAC1* 基因的空间表达[J]. *上海海洋大学学报*, 2014, 23(5): 642–648.
- LI H, XU Y P, BAO B L. Different expression pattern of *HDAC1* before and during the process of metamorphosis in *Paralichthys olivaceus* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(5): 642–648.
- [17] 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.
- LI L K, BAO B L. Expressional pattern of *epigen* gene in metamorphosing *Paralichthys olivaceus* using whole-mount in situ hybridization[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(6): 929–934.
- [18] FASICK J I, ROBINSON P R. Mechanism of spectral tuning in the dolphin visual pigments[J]. *Biochemistry*, 1998, 37(2): 432–438.
- [19] YOKOYAMA S, TAKENAKA N. The molecular basis of adaptive evolution of squirrelfish rhodopsins[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2004, 21(11): 2071–2078.
- [20] TREZISE A E, COLLIN S P. Opsins: evolution in waiting [J]. *Current Biology*, 2005, 15(19): R794–R796.
- [21] CHENG C L, GAN K J, FLAMARIQUE I N. The ultraviolet opsin is the first opsin expressed during retinal development of salmonid fishes[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2007, 48(2): 866–873.
- [22] SHI Y S, YOKOYAMA S. Molecular analysis of the evolutionary significance of ultraviolet vision in vertebrates [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(14): 8308–8313.

Cloning of *SWS1* gene and expression of five opsin genes in larval flounder *Paralichthys olivaceus*

CHEN Xinye, GUO Hua, BAO Baolong

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

Abstract: Fish perceive light intensity and wavelength mainly through visual opsins. The 1 317 bp full-length *SWS1* cDNA sequence of *Paralichthys olivaceus* was first cloned in this research containing 1 077 bp length ORF, encoding 358 amino acid of cone opsin. It indicated that the larval flounder have the potential ability to perceive ultraviolet rays. In addition, qRT-PCR showed that the related expression of rod opsin *RH1* and *SWS1* had no significant changes. While the related expression of cone opsin genes *RH2* and *SWS2* was significantly enhanced from first hatched larvae to 13th day after hatching (DAH) larvae; *LWS* gene was significantly enhanced from DAH6, and then descend to DAH13 slowly. In eyes, furthermore, RNA whole mount *in situ* hybridization revealed that the signals of opsin genes were mainly expressed in the peripheral retina and crystal and *SWS2* expressed later than other opsin genes. Unexpectedly, the expressions of opsin genes were found in skin, fins, gills, intestine and other tissues extensively.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; larva; rod opsin; cone opsin; gene expression