

文章编号: 1674-5566(2016)01-0008-10

## 牙鲆 *lin-29* 基因的全长 cDNA 克隆、鉴定及其在早期发育中的表达分析

高丽娜, 付元帅, 施志仪, 苏艳芳, 张红梅

(上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 通过 PCR 技术, 从牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 总 RNA 中获得牙鲆 *lin-29* 基因 cDNA 序列, 该序列全长 1 769 bp, 包括 1 329 bp 开放阅读框, 编码 442 个氨基酸, 预测其是一种多锌指结构蛋白; 氨基酸序列对比分析显示, 牙鲆 LIN-29 与大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 的同源性最高, 达 95.25%; 系统进化树分析表明, 牙鲆与其他鱼类聚集一支, 并且与罗非鱼的进化关系最近。荧光定量 PCR 显示, 在牙鲆胚胎和仔鱼发育阶段, 以原肠胚期 *lin-29* 表达量最高; 组织表达分析表明, 脑中表达最高, 肌肉中最低。外源甲状腺激素 (TH) 在牙鲆仔鱼发育初期 (TH 处理后 2 d、5 d) 下调 *lin-29* 表达, TH 处理后 21 d (36 dph) 和 26 d (41 dph) 上调 *lin-29* 基因表达, 同时, 硫脲 (TU) 处理均显著上调 *lin-29* 表达。结果显示牙鲆 *lin-29* 基因可能在牙鲆早期发育过程中扮演着重要的角色, 为进一步研究 *lin-29* 在牙鲆生长发育中的功能奠定基础。

**关键词:** *lin-29*; 牙鲆; 变态发育; 甲状腺激素; 硫脲; 基因表达

**中图分类号:** S 917      **文献标志码:** A

异时性 (heterochrony) 是指在不同生物的发生过程中, 两个发育事件发生的时间点有相对的改变<sup>[1-3]</sup>。异时性基因控制着整个发育过程的时间性和空间性, 决定细胞的命运, 从而保证各种器官的准确定位和适时发育<sup>[4]</sup>。目前在 *Caenorhabditis elegans* 中研究最多的异时性基因有: *lin-14*<sup>[5]</sup>、*lin-28*<sup>[6]</sup>、*lin-41*<sup>[7]</sup>、*hbl-1*<sup>[8-9]</sup>、*lin-42*<sup>[10]</sup>、*lin-29*<sup>[4,7,11]</sup> 和 microRNA *lin-4*<sup>[12-13]</sup>、*let-7*<sup>[13-14]</sup> 等。

*lin-29* 基因编码一种锌指蛋白, 这种锌指蛋白含有半胱氨酸 (Cys) 2 和组氨酸 (His) 2, 且具有 5 种锌指结构 (zf1-zf5), 该蛋白在线虫中控制缝线细胞从幼虫第四期到成虫蜕变期的终末分化, 是幼虫发育到成虫的开关, 主要抑制第四期幼虫皮下细胞中的表皮基因, 激活成虫的表皮基因来决定皮下细胞分化的命运<sup>[11,15-17]</sup>。遗传学分析表明: *lin-29* 的功能缺失型突变体会使线虫的表皮细胞停止蜕皮和分化<sup>[18]</sup>。在线虫中, *lin-29* 与

*lin-28*、*let-7*、*lin-41* 和 *hbl-1* 等组成时空性发育调控网络, 控制幼虫到成虫的发育, *lin-29* 在 *lin-28*、*let-7* 和 *lin-41* 等异时性基因的下游, *lin-28* 可以负调控 *lin-29*, 下调 LIN-41 蛋白水平会解除对 *lin-29* 的抑制, 促进线虫从第四期幼虫向成虫的转变<sup>[7]</sup>。在人、小鼠、非洲爪蟾和斑马鱼等脊椎动物中, *lin-29* 又叫 zinc finger protein 基因, 但其是否参与脊椎动物的时序性发育调控并未见报道。在牙鲆中, 目前未见 *lin-29* 基因的相关研究。

牙鲆是一种冷温性底栖鱼类, 因其个体大、生长快、繁殖能力强的特点, 成为我国重要的海洋经济鱼类之一, 不但是重要的捕捞对象, 也是主要的海水增殖鱼类<sup>[19]</sup>。长期以来, 国内的许多水产科研工作者对鲆鲽鱼的人工选育、雌核发育、基因组辅助育种以及相关经济性状基因的功能等开展了大量的工作<sup>[20-22]</sup>。牙鲆早期发育中, 有一个胚后仔鱼向稚鱼发育中的典型变态现象, 变态前后其形态、组织器官结构以及生活习

收稿日期: 2015-04-17      修回日期: 2015-05-22

基金项目: 国家自然科学基金 (31172392); 上海市教育委员会科研创新项目 (1522083); 上海市自然科学基金 (15ZR1420600)

作者简介: 高丽娜 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物学。E-mail: szj\_gln@163.com

通信作者: 施志仪, E-mail: zyshi@shou.edu.cn

性等都发生了显著的改变<sup>[23]</sup>。近年来,牙鲆的胚后变态发育引起了许多学者的关注,特别是其变态发育机制的研究。*lin-29* 是否也在牙鲆的早期发育中起作用? 至今尚未见有报道。因此,本研究克隆了 *lin-29* 基因及以定量 PCR 方法检测 *lin-29* 在牙鲆成鱼组织、牙鲆胚胎、仔鱼各发育时期的表达水平,研究了 TH、TU 对 *lin-29* 在牙鲆发育过程中表达的影响,以期为进一步阐明 *lin-29* 在牙鲆发育过程中的功能研究奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料与试剂

牙鲆成鱼:购自上海市铜川路水产品市场;牙鲆胚胎和仔鱼:采集于中国水产科学研究院北戴河中心实验站。实验试剂:总 RNA 提取试剂(Trizol<sup>®</sup> Reagent)购自 Invitrogen 公司;M-MLV、*Taq* DNA 聚合酶、DNaseI、dNTP、PrimeScript<sup>™</sup> 1st Strand cDNA Synthesis kit、3'-RACE 和 5'-RACE 试剂盒以及 pMD<sup>®</sup> 19-T 载体购自大连 TaKaRa 生物工程有限公司;IQTM SYBR Green Supermix 购自 BIO-RAD;DNA Marker、琼脂糖、DNA 纯化回收试剂盒、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购自天根生化科技有限公司;TH(0.1 mg/L)、TU(0.1 mg/L)购自 Sigma 公司。

### 1.2 实验鱼和样品采集

成鱼组织取样:将牙鲆成鱼(3尾)解剖后取其脑、鳃、肌肉、心脏、肝脏、脾、胃、肾、肠、性腺组织,经 DEPC 水洗净后迅速置于液氮中,再存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

胚胎细胞采集和仔鱼孵化:牙鲆成鱼饲养于(16 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 的过滤海水中,在产卵期进行人工授精,受精卵于(15 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 的过滤天然海水中孵化(3d)出膜,孵化后至仔鱼变态结束期间投入轮虫、卤虫无节幼体进行饲养。按照 MINAMI<sup>[24]</sup> 的牙鲆早期发育阶段划分方法采样,即分别采集未受精卵(E0)、受精后 0.5 h 的受精卵(E1)、受精后 26 h(原肠胚期 E2)、受精后 71 h(心跳期 E3)、出膜后 3 d(3 dph)、9 d(9 dph)、14 d(14 dph)、17 d(17 dph,变态前,眼睛即将开始移位)、20 d(20 dph,右眼已经开始移位)、23 d(23 dph,前变态,右眼移至背侧但从左眼侧还无法看到右眼)、29 d(29 dph,变态高潮,右眼可在左眼侧看到但还未移至背中线处)、36 d(36 dph,

后变态,右眼位于背中线处)和 41 d(41 dph,两只眼睛均位于头部左侧)的仔鱼迅速在液氮中速冻后存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

激素处理:用外源性 TH(0.1 mg/L)和 TU(30 mg/L)<sup>[25]</sup>处理 14 dph 的仔鱼,处理后第 3、9、15、22 和 27 天后,即牙鲆出膜后 17 dph、23 dph、29 dph、36 dph 和 41 dph 取样(n=3),迅速用 DEPC 水冲洗干净后立即放入 RNastore 保存液中或置于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.3 RNA 抽提和反转录

依照 Trizol<sup>®</sup> Reagent 试剂盒说明书中方法提取牙鲆各时期样品以及成鱼各组织总 RNA。用 Agilent 2100 Bioanalyzer 测定总 RNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 均在 1.8~2.0 之间。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性及其质量,满足实验要求,置于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

以 DNase I (Promega)处理后的总 RNA 为模板,按以下体系与程序进行反转录:在除酶离心管中加入 2  $\mu$ g 总 RNA,0.5  $\mu$ L Oligo dT Primer (50 mol/L),0.5  $\mu$ L Random Primers,补充 DEPC ddH<sub>2</sub>O 至总体积 10  $\mu$ L;70 $^{\circ}$ C 放置 5 min 后立即置于冰上 5 min;然后向上述反应体系中加入以下试剂:M-MLV RT 5 $\times$  buffer 5  $\mu$ L,RNasin(40 U/ $\mu$ L)0.65  $\mu$ L,M-MLV Rtase(200 U/ $\mu$ L)1  $\mu$ L,dNTPs(2.5 mmol/L)5  $\mu$ L,补充 DEPC ddH<sub>2</sub>O 至总体积 25  $\mu$ L;混匀后于 PCR 仪上反转录,反应条件为 25 $^{\circ}$ C 10 min,37 $^{\circ}$ C 1 h,95 $^{\circ}$ C 5 min。得到的 cDNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

### 1.4 牙鲆 *lin-29* 的克隆

根据 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上发布的已知物种同源序列,设计多对 *lin-29* 引物(表 1),用牙鲆各时期总混合的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50~60 $^{\circ}$ C 退火 30 s(根据引物不同设置温度梯度),72 $^{\circ}$ C 延伸 30~60 s(根据克隆片段长短不同设置),共 34 个循环。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后的目的条带用 Gel Extraction Kit (Tiangen, China) 纯化回收。后将纯化产物连接到 pMD 19-T Vector 上,16 $^{\circ}$ C 连接过夜后转化入大肠杆菌 DH5 菌株中,固体培养基上 37 $^{\circ}$ C 培养后挑选合适菌落进行培养,再经菌落 PCR 验证后取阳性克隆送上海生物工程技术有限公司测序。

根据克隆出的牙鲆 *lin-29* 片段设计 3'-RACE 和 5'-RACE 的特异性引物(表 1)并依照 5'-Full RACE Kit (TaKaRa) 和 3'-Full RACE Kit 试剂盒说明书进行 RACE PCR 扩增。1% 琼脂糖凝胶电泳回收 RACE PCR 产物,进行连接、转化、克隆和测序。

表 1 用于 PCR 扩增的引物序列  
Tab. 1 The primer sequences for PCR amplification

引物 primers	引物序列(5' → 3') primer sequences
<i>lin-29</i> degenerate primer-F	GCSGARCTCGATTAAACAA
<i>lin-29</i> degenerate primer-R	GACATGTGCTTCATAAGGTAGGT
<i>lin29</i> 5'-outer-R	CACGGAATGTCAGTGCCAA
<i>lin29</i> 3'-outer-F	CAAGCCGTACAAATGTCTTAACTG
<i>lin29</i> qPCR-F	TGTCTAACCTCCAGTCTCA
<i>lin29</i> qPCR-R	TAGGCACGGTAGCAGTTA
$\beta$ -actin-F	GGAAATCGTCCGTGACATTAAG
$\beta$ -actin-R	CCTCTGGACAACGGAACCTCT

### 1.5 序列和进化树分析

用 DNAMAN 软件将已得牙鲆 *lin-29* 片段除去序列间重叠部分、RACE 试剂盒添加的两端引物部分,拼接得到基因全长。用 Primer Premier 5 软件及 SMS (The Sequence Manipulation Suite) (<http://www.bio-soft.net/sms/index.html>) 预测并生成 *lin-29* 编码的氨基酸序列(图 1),再用 SMART ([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode.cgi?NORMAL=1](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)) 分析得到牙鲆 *lin-29* 编码翻译的主要二级结构(图 2)。用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测牙鲆 *lin-29* 基因的蛋白质三级结构(图 3)。将预测得到的牙鲆 *lin-29* 编码的氨基酸序列与 NCBI 数据库的其他生物 *lin-29* 编码的氨基酸序列进行比对并通过 MEGA 5.0<sup>[16]</sup> 软件和 DNAMAN 软件分别绘得氨基酸序列的系统进化树[采用 NJ (Neighbor-Joining 1000 bootstrap) 法](图 4)和各物种间氨基酸序列比对图(图 5)。从 NCBI 数据库提取的与牙鲆 *lin-29* 氨基酸序列相关的代码如下: zinc finger protein 362-like isoform X2 [*Larimichthys crocea*] (XP\_010730702.1); zinc finger protein 362-like isoform X1 [*Oreochromis niloticus*] (XP\_003444842.1); zinc finger protein 362-like isoform X1 [*Cynoglossus semilaevis*] (XP\_008316855.1); zinc finger protein 362-like isoform X2 [*Maylandia zebra*] (XP\_004554194.1); zinc finger protein 362-like [*Oryzias latipes*] (XP\_004070413.1); unnamed protein product

<http://www.shhydxxb.com>

[*Oncorhynchus mykiss*] (CDQ66707.1); zinc finger protein 362 [*Danio rerio*] (NP\_001083017.1); zinc finger protein 362 [*Orcinus orca*] (XP\_004266543.1); zinc finger protein 362 [*Bos taurus*] (NP\_001179097.1); zinc finger protein 362 isoform X2 [*Callithrix jacchus*] (XP\_008999100.1); zinc finger protein 362 [*Otolemur garnettii*] (XP\_003801314.1); zinc finger protein 362 isoform X2 [*Ficedula albicollis*] (XP\_005057594.1); zinc finger protein 362 isoform X3 [*Cavia porcellus*] (XP\_005004277.1); zinc finger protein 362 [*Falco peregrinus*] (XP\_005237631.1); zinc finger protein 362 [*Mus musculus*] (NP\_001074567.1); zinc finger protein 362 (ZNF362), mRNA [*Homo sapiens*] (NM\_152493.2); zinc finger protein 362 (znf362), mRNA [*Xenopus (Silurana) tropicalis*] (NM\_001078882.1); Protein LIN-29, isoform a (*lin-29*) mRNA, complete cds [*Caenorhabditis elegans*] (NM\_064144.5); ISE/inbred ISE genomic scaffold, scaffold\_pathogens\_Hcontortus\_scaffold\_18。

### 1.6 定量 PCR

设计高效特异的引物(表 1),在 CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) 上进行实时定量检测。

绘制目的基因和内参基因( $\beta$ -actin)的标准曲线,反应体系共 20  $\mu$ L:1  $\mu$ L cDNA (100 ng ~ 0.8 ng, 5 倍浓度梯度稀释),上下游特异性引物(*lin-29* qPCR-F 和 *lin-29* qPCR-R)各 0.5  $\mu$ L, 2  $\times$  iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, USA) 10  $\mu$ L 及 dH<sub>2</sub>O 8  $\mu$ L。反应程序:95  $^{\circ}$ C 3 min, 95  $^{\circ}$ C 10 s 和 61  $^{\circ}$ C 20 s, 采集荧光 39 次(两步法), 65  $^{\circ}$ C 0.05 s。熔解曲线的扩增、标准曲线结果显示目的基因和内参基因的 R 值均大于 0.99, 相应的扩增效率(E)均介于 95% ~ 100% 之间, 并且目的基因和内参基因的 M 值相差小于 0.1。随后对所有样品进行定量检测, RT-PCR 反应体系和程序同上, 重复实验 3 次。

### 1.7 统计分析

运用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算牙鲆 *lin-29* 的相对表达水平, 其数值用平均值  $\pm$  标准误差 (mean  $\pm$  SE) 表示, n = 3。牙鲆胚胎和仔鱼不同发育时期样品以未受精卵(E0)中的相对 mRNA 量为对

照,牙鲆成鱼不同组织以肌肉中的相对 mRNA 量为对照。试验数据采用 SigmaPlot 12.5 软件进行方差分析和相对表达分析,当  $P < 0.05$  时表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 *lin-29* 基因的克隆及结构分析

以牙鲆各时期总 RNA 池为模板,以其兼并引物(表 1)、3'-RACE 和 5'-RACE 法克隆获得

牙鲆 *lin-29* cDNA 序列。基因全长 1 769 bp,包括 112 bp 的 5'-UTR、328 bp 的 3'-UTR 和 1 329 bp 的开放阅读框,并预测其编码 442 个氨基酸(图 1)。*lin-29* 氨基酸序列分析后得到其蛋白质二级结构(图 2),有 6 个主要的锌指结构(ZnF-C2H2),各锌指结构分别由氨基酸序列中的第 249~271、277~299、305~327、333~357、363~385 及 393~415 个氨基酸构成。这与其他物种中已知的类似氨基酸序列形成的锌指结构蛋白

```

1 gaaataagcgaccgggaagcgggtgggactggaggcaggcagagagagaacatcaagcttttatattaagct
1 M A E P R F N N P Y F W P
76 gcgctcgcaacacaatatctgcagccaggacccaaggATGGCAGAGCCTCGATTAAACAACCCGTATTTCTGGCC
14 P P P S M P G Q L D N L V L I N K I K E Q L M A E
151 GCCACCTCCATCCATGCCGGGCCAGCTGGATAACCTGGTGCTCATTAACAAGATCAAGGAGCAGCTGATGGCCGA
39 K I R P L H L P P T S T P S Q Q P L L V S T S N Q
226 GAAGATCCGACCCTTGACCTGCCGCTACCTCCACCCCTTCCAGCAGCCCCCTGCTGGTGTCACCTCGAACCA
64 D G S N Q H G M S V P K H Q Q E L Q G H H P Q A
301 AGACGGTAGCAACCAGCACGGAATGTCAGTGCCAAAAGCACCAGCAGCAGGAGCTGCAGGGCCACCACCCGAGGC
89 Q G S G Q P D I A L H A R P A S S S G P D G T M D
376 ACAGGGCTCTGGACAGCCAGACATCGCTCTGCATGCTGCCCGCCTCCAGCTCTGGACCAGATGGAACAATGGA
114 D K S A V K A K G L W E D W H M R Q L G E Q T G R
451 CGACAAGTCAGCAGTGAAGGCTAAAGGATTGTGGGAAGACTGGCACATGAGACAGCTTGGCGAGCAAACCTGGACG
139 I N H R S A L A P S S R P D S H I I S E A L T P T
526 CATCAACCATCGCTCAGCGCTGGCTCCCTCATCCCGACCTGACAGCCACATCATCTCCGAGGCCCTGACCCCCAC
164 T P T S S S H N R L G G A P S V N I I S G L A S G
601 GACTCCAACCTCCAGCAGCCACAACCCCTCGGGCGTGCCCCCTCTGTGAACATCATCTCTGGGCTGGCCAGTGG
189 P G M D H M K V G L A G L L G P P P K A P R G R
676 TCCGGGCATGGACCACATGAAGGTTGGAGGCTGGCAGGACTGTTGGGCCCCCACCACCAAGCCACCCGGGGAGC
214 K K I K A E N P S G P L L V V P Y P I L A D Q G C
751 GAAGAAGATTAAGCTGAAAACCCATCGGGTCCTCTGCTGGTGGTGCCCTACCCATTCTAGCTGACCAAGGCTG
239 V T I A P K E G K T Y R C K V C P L T F L T K S E
826 TGTCACAATTGCACCCAAAGAGGGCAAACCTACAGATGCAAAGTGTGCCACTCACCTTCCTAACCAAGTCCGA
264 M Q I H S K S H T E A K P H K C P H C T K T F A N
901 GATGCAGATTCACCTCAAGTCTCACACGGAGGCCAAAACACACAAGTGTCCCCACTGCACCAAGACGTTCCGCCAA
289 A S Y L S Q H L R I H L G I K P Y H C S Y C E N S
976 CGCCTCTACCTGTCCGAGCACCTGGCATCCACCTGGGGATCAAACCTATCACTGCTCCTACTGCGGAGAACTC
314 F R Q L S H L Q Q G H T R I H T G D R P Y K C A H P
1051 CTTCGTCAGCTGTCACCTGCAGCAGCACACCAGATCCACACCCGGTGATAGGCTTATAAAATGTGCCACCC
339 G C E K A F T Q L S N L Q S H Q R Q H N K D K P Y
1126 CGGATGTGAAAAGGCTTTTACCCAGCTGTCTAACCTCCAGTCTCACCAGAGGCAGCACAATAAAGACAAGCCGTA
364 K C P N C Y R A Y S D S A S L Q I H L S A H A I K
1201 CAAATGTCCCTAACTGCTACCGTGCCCTACTCAGACTCAGCTTTCATTGCAGATCCACTTGTGAGCGCAGCCATCAA
389 N A K A Y C C S M C G R A Y T S E T Y L M K H M S
1276 AAACGCTAAGGCCCTACTGCTGTAGCATGTGTGGCCGGGCATACACCTCAGAGACCTACCTTATGAAGCACATGTC
414 K H T V V E H L V S H Q S P Q R T E S P N I P I R
1351 TAAACACACGGTGGTGGAGCACCTAGTGAGCCACCAGTCGCCCCAGCGGACCGAGTCCCCAACATCCCCATACG
439 I S L I *
1426 GATCTCCCTCATCTGAgccccccccccggcggctcggcagcaggtcggattcggagtctatggtcggctggagc
1501 ttgtgaggccctgcacccacggccatctacataagccttaccattagcattatgacagctgacaaccattcagacc
1576 tatacactttttttcacggtacaactatgtaaatgttgtaatcggctccaactaatcatttaaatcagttttctcc
1651 ctcatcaatctacactcagctctctgtgccacattatgacaaagccaaagtggaagatttgattggagttacctc
1726 aagtattgctcacactcataaatatcagtcacccccaaaaaaaaa

```

图 1 牙鲆 *lin-29* 的 cDNA 全长及其预测氨基酸序列

Fig. 1 The full-length cDNA and deduced amino acid sequences of *lin-29* in *Paralichthys olivaceus*

\* 表示终止密码子。

\* indicates stop codon.

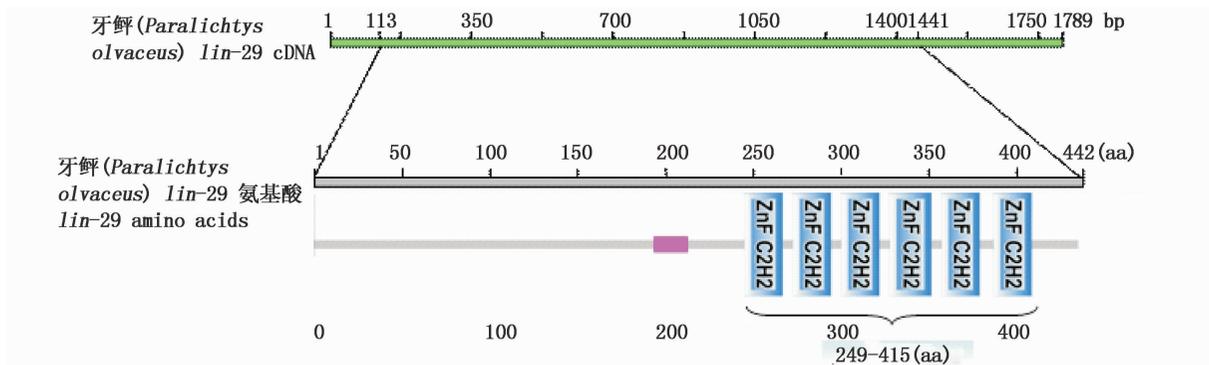


图 2 牙鲆 *lin-29* 编码的 6 个主要保守性结构域

Fig. 2 Principal conservative domains of Flounder *lin-29* amino acid sequence



图 3 预测的牙鲆 LIN-29 蛋白的相似三级结构

Fig. 3 Predicted tertiary structure of Flounder LIN-29

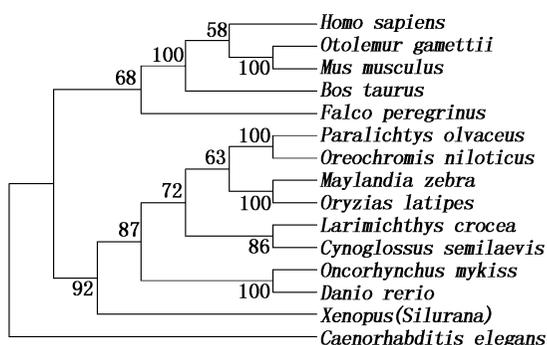


图 4 LIN-29 氨基酸序列构建的系统进化树

Fig. 4 A phylogenetic tree for amino acid sequences of LIN-29

分支上的数字是 Bootstrap 值。

Bootstrap values are shown at the branch points.

(zinc finger protein 362-like, NCBI 数据库) 相似。预测得到的牙鲆 LIN-29 蛋白质的三级结构图(图 3)中,蛋白由  $\alpha$ - $\beta$  $\beta$  $\alpha$ - $\beta$  $\beta$  $\alpha$ - $\beta$  $\beta$  $\alpha$ - $\beta$  $\beta$  $\alpha$  构成,是一种锌指成对间隔排列的锌指蛋白。

## 2.2 LIN-29 序列比对及进化树构建

由 NJ 系统进化树(图 4)可知牙鲆 LIN-29 氨基酸序列与鱼类系统进化关系最近,该图同时也表明 LIN-29 从低等的无脊椎动物秀丽隐杆线虫到高等脊椎动物到人类的系统进化关系。通过多物种 LIN-29 氨基酸序列比对(图 5)分析表明:牙鲆 LIN-29 基因与大黄鱼、尼罗罗非鱼、半滑舌鲷、青鳉、斑马鱼、白领姬鹁、豚鼠、非洲爪蟾和人类的同源性依次为 95.25%、94.12%、93.47%、92.53%、81.49%、71.11%、70.88%、69.30% 和 68.42%。

## 2.3 *lin-29* 基因在牙鲆早期发育阶段和成体组织中的表达

定量结果显示,牙鲆 *lin-29* 基因在牙鲆未受精卵、胚胎期和仔鱼发育的各个阶段均有表达,并且多个发育时间点表达水平有显著差异(图 6)。在牙鲆早期发育过程中,牙鲆 *lin-29* 基因在原肠胚期(E2)表达量最高;随着发育时间变化,到心跳期,*lin-29* 的表达量迅速下降,出膜后 3 天(3 dph)时降到最低;随后 *lin-29* 的表达又开始逐渐增加,到孵化后 17 天(17 dph)时表达量再次下降,孵化后 29 天(29 dph)表达量达到 E2 期的 41.2% 左右,再逐步减少。

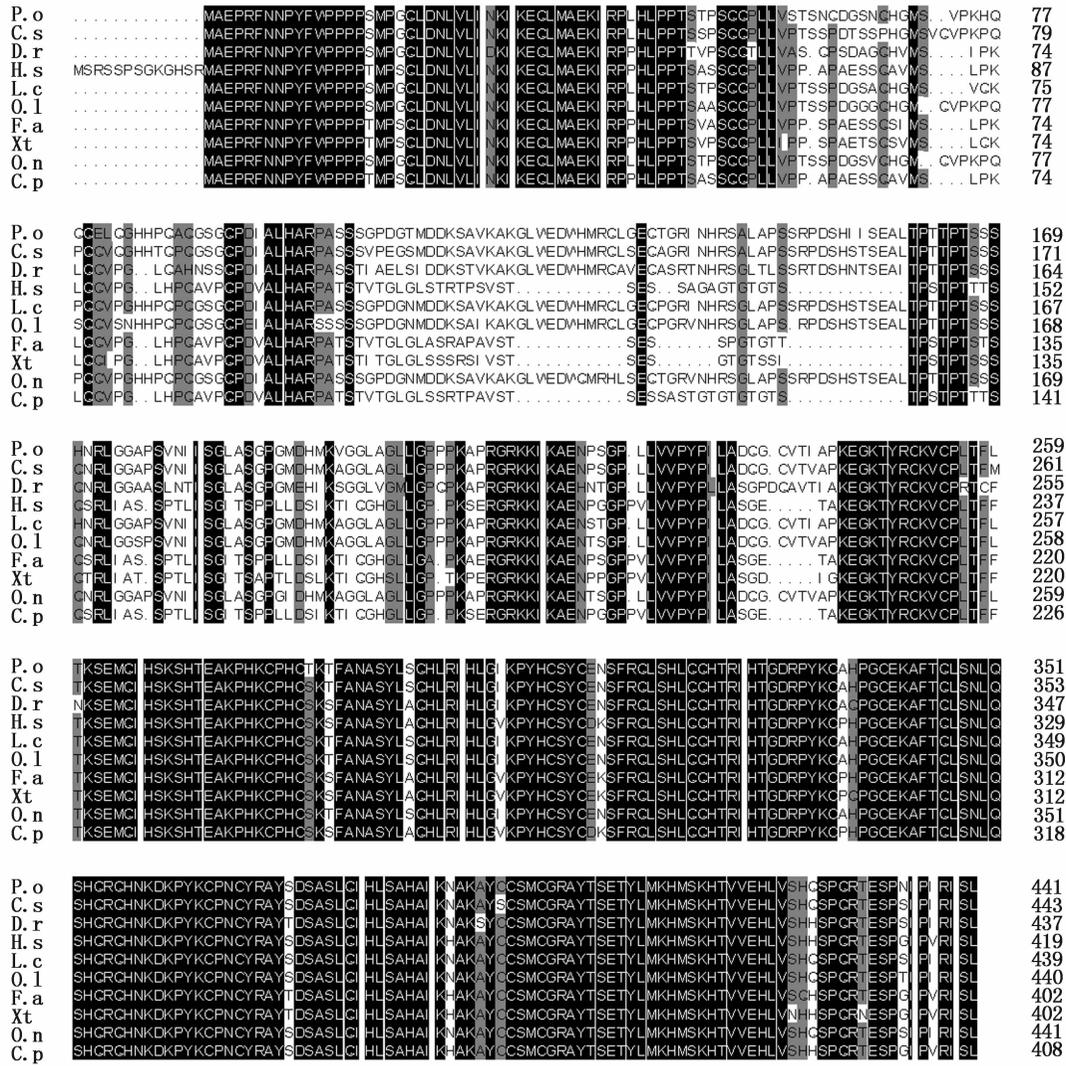


图 5 牙鲆 LIN-29 和其他物种的氨基酸序列对比

Fig. 5 Amino acid sequence alignment of *Paralichthys olivaceus* LIN-29 with that of other species

黑色表示这些物种间的氨基酸高度保守。

Light black blocks show identical amino acids residues between those sequences shown.

P. o.; *Paralichthys olivaceus*; C. s.; *Cynoglossus semilaevis*; D. r.; *Danio rerio*; H. s.; *Homo sapiens*; L. c.; *Larimichthys crocea*; O. l.; *Oryzias latipes*; F. a.; *Ficedula albicollis*; X. t.; *Xenopus tropicalis*; O. n.; *Oreochromis niloticus*; C. p.; *Cavia porcellus*.

图 7 表明牙鲆 *lin-29* 基因在所检测的组织中广泛表达;在几个不同组织中的表达有显著差异:*lin-29* 基因在脑中表达量最高,约是肌肉中(最低)的 152 倍、心脏中的 17 倍、肠中的 6 倍 ( $P < 0.05$ );牙鲆 *lin-29* 在鳃、肾、胃、肝脏和性腺中的表达水平没有显著差异。

### 2.4 甲状腺激素 (TH) 和硫脲 (TU) 处理后 *lin-29* 的表达

本实验已有研究表明甲状腺激素 (TH) 能够促使牙鲆仔鱼变态发育,在此基础上运用外源性的 TH 和 TU 处理变态前仔鱼,然后对不同变态阶段的仔鱼进行 *lin-29* 基因定量检测,结果表明,

*lin-29* 基因的水平明显受到 TH、TU 的影响(图 8)。在 TH 处理后 2 d(17 dph) 和 5 d(20 dph), TH 组的 *lin-29* 表达水平显著低于对照组,TH 处理后 21 d(36 dph) 和 26 d(41 dph) 时 TH 组的表达水平显著高于对照组,TH 处理后 8 d(23 dph) 和 14 d(29 dph) 的 *lin-29* 表达量与对照组没有明显差异 ( $P < 0.05$ ); TU 处理后的每个检测时期 *lin-29* 基因的表达量都显著高于对照组,且除了 TU 处理后 26 d(41 dph) 外,各个检测时期 TU 组的 *lin-29* 基因表达量也明显高于 TH 组。

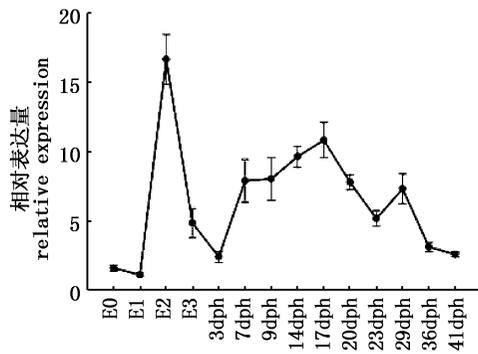


图6 牙鲆 *lin-29* 在早期发育中的相对表达

Fig. 6 Relative levels of *lin-29* mRNA during early development of flounder

这些数据以参照组未受精卵(E0)为基础,其数值用平均值  $\pm$  标准误差(mean  $\pm$  SE)表示。E1:受精后 0.5 h;E2:原肠胚期;E3:心跳期。

Expression values were normalized to those of  $\beta$ -actin, and data are expressed as the means  $\pm$  Standard Error (SE) ( $n = 3$ ) from the calibrator group (E1). E1: the fertilized stage; E2: gastrula stage; E3: heart-beating stage.

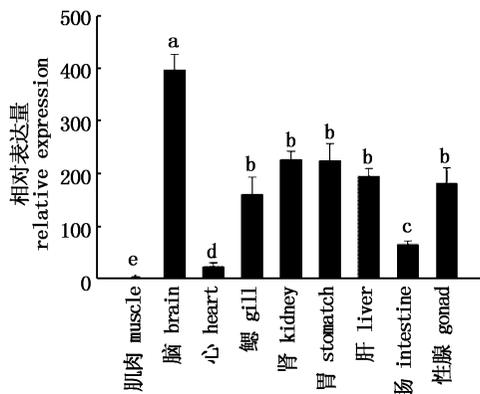


图7 牙鲆成鱼组织中 *lin-29* 基因的表达  
Fig. 7 Relative expression levels of *lin-29* mRNA in adult tissues of flounder

这些数据以参照组(肌肉)为基础,其数值用平均值  $\pm$  标准误差(mean  $\pm$  SE)表示。相同字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )。

The data are expressed as the means  $\pm$  Standard Error (SE) ( $n = 3$ ) from the calibrator group (Muscle) and expression values were normalized to those of  $\beta$ -actin. The same letters represented the difference is not significant ( $P > 0.05$ ).

### 3 讨论

#### 3.1 牙鲆 *lin-29* 基因的氨基酸结构特征和同源性

本研究克隆了牙鲆 *lin-29* 基因 cDNA 序列,全长 1 769 bp,开放阅读框编码 442 个氨基酸。氨基酸序列同源比对分析显示,牙鲆 *lin-29* 基因

的氨基酸序列与大黄鱼的一致性最高,达到 95.25%,其次与尼罗罗非鱼、半滑舌鳎和青鳉的一致性都在 90% 以上,与斑马鱼的一致性为 81.49%,而与两栖类的非洲爪蟾、鸟类的白领姬鹀和哺乳类的豚鼠的一致性在 70% 左右,与人类的一致性为 68.42%;系统进化树分析显示牙鲆与各种鱼类处于同一大分支,与线虫的进化距离最远。这些结果表明 *lin-29* 基因的氨基酸序列在物种的系统进化中是相对保守的。

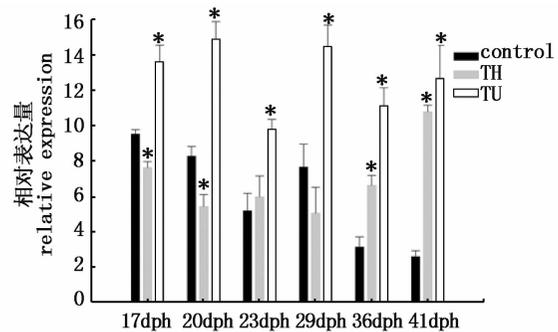


图8 *lin-29* 在 TH 和 TU 处理的仔鱼变态期的相对表达

Fig. 8 Relative expression levels of *lin-29* in TH and TU-treated larvae during flounder metamorphosis

这些数据以参照组(对照组 41 天)为基础,其数值用平均值  $\pm$  标准误差(mean  $\pm$  SE)表示。Control:未处理组;TH 和 TU 分别表示甲状腺激素和硫脲处理组;\* :有显著差异( $P < 0.05$ )。

Expression values were normalized to those of  $\beta$ -actin, and data are expressed as the means  $\pm$  Standard Error (SE) ( $n = 3$ ) from the calibrator group (41 d-Control). Control displayed the untreated group; TH and TU displayed the thyroid hormone and thiourea-treated group. The asterisks represented the statistical significant differences ( $P < 0.05$ ).

通过对牙鲆 *lin-29* 基因的氨基酸序列和蛋白结构预测分析显示,LIN-29 是一种多锌指结构的蛋白,含有 6 个典型的锌指结构域,其蛋白结构由 6 个  $\alpha$  螺旋和 10 个  $\beta$  折叠构成,属于锌指蛋白家族中的一员。锌指蛋白是一类具有手指状结构域的转录因子,可以结合 DNA 和 RNA、DNA-RNA 杂交双链分子、其他锌指蛋白或自身结合,在基因表达调控、细胞分化、胚胎发育、增强物种适应性等方面具有重要的作用<sup>[26-27]</sup>。目前,有关 *lin-29* 基因功能研究主要是在线虫中的异时性调控作用,其作为一种异时性基因,控制着线虫第四期幼虫向成虫的发育。研究证实,在

线虫中 *lin-29* 的功能缺失型突变体会使线虫的表皮细胞停止蜕皮和分化,导致幼虫向成虫的发育过渡失败<sup>[18]</sup>。该研究中,通过对牙鲆 *lin-29* 基因的序列和蛋白结构分析,推测其可能在牙鲆早期发育中扮演着重要的作用。

### 3.2 牙鲆 *lin-29* 基因的表达模式

*lin-29* 是一种异时性基因,它在线虫发育阶段的研究已经比较深入,*lin-29*、*lin-28*、*let-7*、*lin-41* 和 *hbl-1* 等组成了线虫的时空性发育调控网络<sup>[7]</sup>。有研究发现,*hbl-1* 和 *lin-41* 会协同阻遏 *lin-29* 的表达,而 *hbl-1* 和 *lin-41* 是 *let-7* mRNA 的靶基因,在线虫幼虫后期阶段,*let-7* 表达作用于其靶基因 *hbl-1* 和 *lin-41* 的 3'-UTR 使其不能正常作用,最终使得 *lin-29* 表达量增加<sup>[8-9,28]</sup>。下调 LIN-41 蛋白水平也会解除对 *lin-29* 的抑制<sup>[7]</sup>。在牙鲆早期发育中的表达谱分析显示,*lin-29* 基因在多个发育时间点的表达水平有显著差异。*lin-29* 基因在原肠胚期(E2)表达量最高,其作为转录因子可能与合子基因的启动以及胚胎三胚层的形成有关,还有待进一步研究。出膜后 *lin-29* 的表达水平逐渐升高,在 17 dph 后又逐渐降低,这可能与仔鱼早期的摄食、适应性、变态前的能量蓄积以及变态前仔鱼向变态期仔鱼的过渡调节有关,这些推论有待进一步研究。

*lin-29* 在牙鲆各组织中广泛表达,它在牙鲆大脑里的表达要显著高于其他组织,已有研究表明 *lin-29* 在线虫阴门肌肉细胞、缝合细胞、咽、头部神经元、腹索神经元、肛门节、末端细胞、锚定细胞、阴门细胞、雄性特异的连接细胞和尾部细胞中均有表达;它主要表达于头部的咽和神经元、尾部的直肠细胞 B、F 和 U 中及在性成肌细胞和其后代也有表达<sup>[29]</sup>,牙鲆中 *lin-29* 在各组织中的表达情况与此一致,大脑表达量也是最高,这可能与大脑的神经生理活动和内分泌调控有关。

### 3.3 *lin-29* 基因在 TH、TU 处理的牙鲆各发育阶段的表达

牙鲆的变态发育像许多其他生物一样受到多种激素的调控,在牙鲆变态阶段,甲状腺激素的水平显著升高,并且其浓度分布具有明显的组织和时间特异性<sup>[30]</sup>。研究表明,外源性 TH 能显著诱导牙鲆仔鱼的提前变态,而硫脲则抑制其仔鱼的变态<sup>[25]</sup>。本研究中检测了 *lin-29* 基因在外

源 TH 诱导和 TU 抑制的仔鱼中的表达水平,在 17 dph 和 20 dph 外源性 TH 显著下调 *lin-29* 的表达,而在 36 dph 和 41 dph 外源性 TH 显著上调 *lin-29* 的表达,硫脲在整个变态过程中都显著上调 *lin-29* 基因的水平,由此我们推测:TH 可能间接调控 *lin-29* 基因的表达,并且在表达早期,外源性 TH 下调 *lin-29* 的水平可能与仔鱼的提前变态存在关联;而在 TU 抑制组中,*lin-29* 的高水平表达可能与仔鱼的变态抑制有关。这些结果初步表明,在 TH 调控牙鲆仔鱼变态的分子信号通路中,*lin-29* 基因可能在仔鱼变态发育中扮演着重要的角色,其相关的功能和作用机制还有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] LIU Z C, AMBROS V. Heterochronic genes control the stage-specific initiation and expression of the dauer larva developmental program in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genes & Development*, 1989, 3(12B): 2039 - 2049.
- [2] SMITH K K. Time's arrow: Heterochrony and the evolution of development [J]. *International Journal of Developmental Biology*, 2003, 47(7 - 8): 613 - 621.
- [3] AMBROS V, HORVITZ H R. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 1984, 226(4673): 409 - 416.
- [4] AMBROS V, MOSS E G. Heterochronic genes and the temporal control of *C. elegans* development [J]. *Trends in Genetics*, 1994, 10(4): 123 - 127.
- [5] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843 - 854.
- [6] MOSS E G, TANG L J. Conservation of the heterochronic regulator *Lin-28*, its developmental expression and microRNA complementary sites [J]. *Developmental Biology*, 2003, 258(2): 432 - 442.
- [7] SLACK F J, BASSON M, LIU Z C, et al. The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor [J]. *Molecular Cell*, 2000, 5(4): 659 - 669.
- [8] LIN S Y, JOHNSON S M, ABRAHAM M, et al. The *C. elegans* hunchback homolog, *hbl-1*, controls temporal patterning and is a probable microRNA target [J]. *Developmental Cell*, 2003, 4(5): 639 - 650.
- [9] ABRAHANTE J E, DAUL A L, LI M, et al. The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs [J]. *Developmental Cell*, 2003, 4(5): 625 - 637.
- [10] JEON M, GARDNER H F, MILLER E A, et al. Similarity

- of the *C. elegans* developmental timing protein LIN-42 to circadian rhythm proteins[J]. *Science*, 1999, 286(5442): 1141 – 1146.
- [11] PAPP A, ROUGVIE A E, AMBROS V. Molecular cloning of *lin-29*, a heterochronic gene required for the differentiation of hypodermal cells and the cessation of molting in *C. elegans* [J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(3): 623 – 630.
- [12] MOSS E G, LEE R C, AMBROS V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA[J]. *Cell*, 1997, 88(5): 637 – 646.
- [13] BAGGA S, BRACHT J, HUNTER S, et al. Regulation by *let-7* and *lin-4* miRNAs results in target mRNA degradation [J]. *Cell*, 2005, 122(4): 553 – 563.
- [14] PASQUINELLI A E, REINHART B J, SLACK F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA [J]. *Nature*, 2000, 408(6808): 86 – 89.
- [15] ROUGVIE A E, AMBROS V. The heterochronic gene *lin-29* encodes a zinc finger protein that controls a terminal differentiation event in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Development*, 1995, 121(8): 2491 – 2500.
- [16] EULING S, BETTINGER J C, ROUGVIE A E. The LIN-29 transcription factor is required for proper morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* male tail[J]. *Developmental Biology*, 1999, 206(2): 142 – 156.
- [17] HARRIS D T, HORVITZ H R. MAB-10/NAB acts with LIN-29/EGR to regulate terminal differentiation and the transition from larva to adult in *C. elegans*[J]. *Development*, 2011, 138(18): 4051 – 4062.
- [18] BETTINGER J C, EULING S, ROUGVIE A E. The terminal differentiation factor LIN-29 is required for proper vulval morphogenesis and egg laying in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Development*, 1997, 124(21): 4333 – 4342.
- [19] 田永胜, 陈松林, 徐田军, 等. 牙鲆不同家系生长性能比较及优良亲本选择[J]. *水产学报*, 2009, 33(6): 901 – 911.
- TIAN Y S, CHEN S L, XU T J, et al. The comparison of growth performances of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families and selection of parents with good trait [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(6): 901 – 911.
- [20] CHEN S L, ZHANG G J, SHAO C W, et al. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle [J]. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253 – 260.
- [21] 刘海金, 王常安, 朱晓琛, 等. 牙鲆单倍体、三倍体、雌核发育二倍体和普通二倍体胚胎发育的比较[J]. *大连水产学院学报*, 2008, 23(3): 161 – 167.
- LIU J H, WANG C A, ZHU X C, et al. Embryonic development of gynogenetic diploid and triploid Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2008, 23(3): 161 – 167.
- [22] NAKAMURA A, SHIKANO L, MIZUTA A, et al. Melanophore development during metamorphosis in pseudo-albinic clone of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2005, 71(5): 729 – 735.
- [23] FU Y S, SHI Z Y, WU M L, et al. Identification and differential expression of microRNAs during metamorphosis of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Plos One*, 2011, 6(7): e22957.
- [24] MINAMI T. The early life history of a flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1982, 48(11): 1581 – 1588.
- [25] INUI Y, MIWA S. Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1985, 60(3): 450 – 454.
- [26] MILLER J, MCLACHLAN A D, KLUG A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes* [J]. *The Embo Journal*, 1985, 4(6): 1609 – 1614.
- [27] LEE M S, GIPPERT G P, SOMAN K V, et al. Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain [J]. *Science*, 1989, 245(4918): 635 – 637.
- [28] CONRAD R, BARRIER M, FORD L P. Role of miRNA and miRNA processing factors in development and disease [J]. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 2006, 78(2): 107 – 117.
- [29] 余刚. 异时性基因在 *Caenorhabditis elegans* 寿命调控中的作用及在小鼠发育中的表达研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2009.
- YU G. Heterochronic genes regulate the lifespan of *Caenorhabditis elegans* and the expression in the development of mouse[D]. Xiamen: Xiamen University, 2009.
- [30] DE JESUS E G, HIRANO T, INUI Y. Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1991, 82(3): 369 – 376.

## Full length cDNA cloning, identification and expression analysis of *lin-29* during early development of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*

GAO Lina, FU Yuanshuai, SHI Zhiyi, SU Yanfang, ZHANG Hongmei

( Key laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** *Lin-29* gene from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) was cloned by PCR, and its gene sequence is 1 769 bp including a 1 329 bp open reading frame (ORF) which encodes a polypeptide of 442 amino acids. The *lin-29* gene was predicted encoding a zinc finger protein and was highly similar to amino acid sequence in other fishes through phylogenetic analysis. BLAST analysis indicated that the *lin-29* from *P. olivaceus* showed an average homology of 95.25% to *Larimichthys crocea*. Real-time quantitative PCR revealed that expression level of the *lin-29* was the highest during gastrulation stage and in the tissue of brain. The expression of *lin-29* was highly up or down-regulated by thyroid hormone (TH) at different stages while thiourea (TU) up-regulated significantly the *lin-29* levels. The results showed that LIN-29 played an important role in development and metabolism of *P. Olivaceus*. These results provided the basic information for further study on the role of *lin-29* gene in the development of *P. olivaceus*.

**Key words:** *lin-29*; *Paralichthys olivaceus*; metamorphosis; thyroid hormone; thiourea; gene expression