

光棘球海胆的主要卵黄蛋白 cDNA 序列分析

周遵春^{1,2}, 包振民¹, 董颖², 赫崇波², 韩家波², 王丽梅²

(1. 中国海洋大学 生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003; 2. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省海洋水产分子生物学重点实验室, 辽宁省应用海洋生物技术开放实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要:提取成熟光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)性腺中的 RNA 做模板, 根据 NCBI 数据库中已知海胆(编号: AB097218, AB192414, AY090112)主要卵黄蛋白 MYP cDNA 保守序列设计引物, 用 LA PCR 方式分段扩增并测序得到了光棘球海胆 MYP cDNA 的全序列。扩增的 cDNA 全长 4 061 bp, 包含 4 047 bp 的开放阅读框, 共编码 1 349 个氨基酸。用 ClustalX1.83 对光棘球海胆与其他几种已知海胆 MYP cDNA 及推导的氨基酸序列进行比对, 用 Megs3.01 计算遗传距离及构建进化树, 结果表明, 光棘球海胆与其他 7 种海胆的 MYP 具有高度的同源性。从氨基酸水平上看, 光棘球海胆与红海胆(*Pseudocentrotus depressus*)亲缘关系最近, 遗传距离为 0.069 ± 0.01 ; 与同科的马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)、紫球海胆(*S. purpuratus*)、中间球海胆(*S. intermedius*)的遗传距离分别是 0.095 ± 0.012 、 0.098 ± 0.011 和 0.101 ± 0.012 ; 与白棘三列海胆(*Tripneustes gratilla*)、拟球海胆(*Paracentrotus lividus*)及绿海胆(*Lytechinus variegatus*)亲缘关系相对较远, 遗传距离分别是 0.216 ± 0.017 、 0.218 ± 0.017 和 0.535 ± 0.028 。获得光棘球海胆 MYP cDNA 序列可为进一步研究 MYP 基因的功能和系统的进化分析奠定基础。[中国水产科学, 2006, 13(3): 352-359]

关键词:光棘球海胆; 主要卵黄蛋白 cDNA; 序列分析

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)03-0352-08

许多种类动物的卵母细胞发育的重要特征是积累足够的卵黄维持胚胎的形成, 卵黄是蛋白、脂肪、碳水化合物的混合物, 主要被分成两类, 一类是在青蛙、线虫、鱼类和一些昆虫(如蚊子)中发现的, 称为卵黄蛋白原(vitellogenin, Vg)^[1-5], 另一类是指卵黄蛋白(yolk protein, Yps), 是在双翅类昆虫中发现的, 包括果蝇^[6]。这两类蛋白都是雌性特有的, 包裹在卵黄小体中, 但是它们的氨基酸序列组成与大小及其合成场所不同。海胆的主要卵黄蛋白(major yolk protein, MYP)是因其在海胆卵中发现的含量最高的一种蛋白而被命名, 分子量在 160~180 kD^[7-10]。与其他仅雌性拥有 Vg 或 Yps 的卵生动物明显不同, 海胆的卵巢和精巢都含有 MYP^[11-13]。最初的研究表明, MYP 是糖蛋白类, 有选择地储存在卵母细胞的卵黄小体、卵和胚胎中, 占总卵细胞蛋白的 10%~15%^[14-16]。由于其含量较高并包装到卵黄小体, 历史上也曾经被划分到 Vg 一类^[11, 17]。Vg 被认为是作为 MYP 的前体存在于

体腔液中, 通过营养吞噬细胞加工和积累成 MYP^[18]。Shyu 等^[17]首先克隆了紫球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*) Vg cDNA 的部分序列, 并验证了 Vg 是一个基因编码的, Vg mRNA 在成熟海胆的雌雄个体的肠道和生殖腺都有表达。Unuma 等^[18]报道了红海胆(*Pseudocentrotus depressus*)的 Vg cDNA 全序列, 并通过 Northern blot 在卵巢、精巢、胃、肠和直肠都检测到 Vg mRNA, 其中性腺的表达水平最高。原位杂交分析表明, 生殖腺内腔独有的营养吞噬细胞含有 Vg mRNA, 因此认为储存在不成熟性腺中的 MYP 主要是通过营养吞噬细胞合成和积累的^[18]。Yokota 等^[19]对马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)的 Vg cDNA 全序列进行了测定和分析, 并对所得的核苷酸及氨基酸序列与已知的几种海胆做了比对。结果表明, 马粪海胆的 Vg 的氨基酸与红海胆、紫球海胆、白棘三列海胆(*Tripneustes gratilla*)及绿海胆(*Lytechinus variegatus*)的同源性分别为 91.3%、91.6%、81.2%和

收稿日期: 2005-08-29; 修订日期: 2005-12-15.

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目资助(20042127).

作者简介: 周遵春(1967-), 男, 副研究员, 博士研究生, 从事海洋生物技术研究. E-mail: zunchun@hotmmail.com

通讯作者: 包振民. E-mail: zmbao@ouc.edu.cn

56.8%,并且对 Vg 仅仅作作为 MYP 前体的功能提出了疑问,认为 Vg 具有更多的功能。Brooks 等^[20]分离了紫球海胆 (*S. purpuratus*) 卵黄小板中的 MYP,发现与先前报道的海胆的 Vg 是一致的,并克隆了 MYP cDNA 全序列,编码的氨基酸序列与分离的 MYP 是一致的,证明了克隆的 cDNA 是编码 MYP 的,该 MYP 的 cDNA 序列与先前 Shyu 等^[17]克隆的该海胆 Vg 的 cDNA 序列是一致的,认为海胆的 MYP 与其他动物的 Vg 没有相似性,被称为 Vg 是不合适的。

迄今为止,NCBI 数据库公布的有 7 种海胆的 MYP(或 Vg) cDNA 全序列或部分序列。光棘球海胆 (*Strongylocentrotus nudus*),是中国北方地区最有经济价值的当地物种之一,对其性腺的发育及生殖状况的研究极其重要。根据已知海胆的 MYP cDNA 的保守序列设计引物,扩增并测序得到了光棘球海胆 MYP cDNA 的全序列(由 TaKaRa 大连公司协助完成),并通过其核苷酸及推导的氨基酸序列与其他 7 种海胆比对,分析了它们之间的进化关系。

1 材料与方法

1.1 RNA 的提取

取 2 个成熟光棘球海胆(♀)的性腺,利用 RNA 提取试剂盒(以下实验所用试剂及引物均来自 TaKaRa)分别提取总 RNA,用 DL2000 Marker 进行琼脂糖电泳检测。选取其中质量较好的一个 RNA

样品用于进一步实验。

1.2 RT-PCR 反应

使用 RNA LA PCR(Long and Accurate PCR)试剂盒对提取的 RNA 进行 RT-PCR。20 μ L 反应体系包括 $MgCl_2$ 4 μ L, 10 $\times$ PCR Buffer 2 μ L, Rnase Free ddH_2O 8.5 μ L, dNTP 2 μ L, RNA 酶抑制剂 0.5 μ L, AMV 反转录酶 1 μ L, Oligo dT-Adaptor 引物 1 μ L, 引物序列为 5' - GTTTTCCCAGTCAC-GACTTTTTTTTTTTTTTTT - 3', 总 RNA 2 μ L, 反应条件:42 $^{\circ}C$ 30 min, 99 $^{\circ}C$ 5 min, 5 $^{\circ}C$ 5 min。

1.3 LA PCR 扩增及 PCR 产物回收

测序引物设计:通过 GenBank 中已知海胆 MYP cDNA 序列(编号:AB097218、AB192414、AY090112)进行同源比对,找出保守序列,设计引物(F 代表正向引物,R 代表反向引物)分段扩增。

LA PCR:以 RT-PCR 产物为模板,进行 PCR 分析。50 μ L 反应体系包括 10 $\times$ LA PCR Buffer (Mg^{2+} Free) 4 μ L, $MgCl_2$ 3 μ L, 正反向引物(20 pmol/ μ L)各 1 μ L, RT-PCR 产物 10 μ L, LA Taq(5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH_2O 30.5 μ L。扩增程序:94 $^{\circ}C$ 变性 2 min; 94 $^{\circ}C$ 30 s, 55 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}C$ 5 min。扩增片段 1 引物为 F4 和 R3, 扩增片段 2 引物为 F6 和 R2(序列见表 1)。

产物回收:用琼脂糖 DNA 片段回收试剂盒切割回收目的片段。

表 1 cDNA 测序所用引物序列
Tab.1 Sequence of primers for cDNA sequencing

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence
F1	5' - GCTGTAACCTGGAGATCATOCTTGATGATTGCCACCAG - 3'
F4	5' - CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACCATCAAYTCARCTOGGGAGAAGTTGYCATC - 3'
F6	5' - CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACAOCATRKCTTGGAATCTGA - 3'
1F	5' - AGGAGCAGTGTATGTTCTGG - 3'
2F	5' - TGTAGAGATCACCCTGTCC - 3'
3F	5' - AGGAGAGCAGGACATCTACA - 3'
4F	5' - ACAAGAACCTGATCTTCTTG - 3'
5F	5' - GAAGACCCAGGACTTCATCC - 3'
R2	5 - TGCTACAATATGGTCGATGTTAATGGTGGTGATCGACCA - 3'
R3	5' - GAGCGGATAACAATTTACACAGGCCRSTDGAGACCTTCTGTGTT - 3'
1R	5' - TTCTTGACCTCTGGGATGTT - 3'
3R	5' - AACTCGCTGACCATOCTCTG - 3'
BoaBEST 引物 M13-47	d(CGCA GGGTT TTCC AGTCA CGAC)

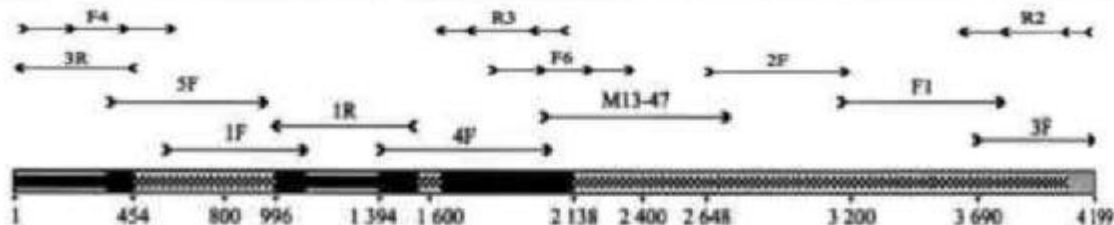


图1 光棘球海胆 MYP cDNA 扩增及测序策略

Fig.1 Amplification and sequence strategy for cDNA encoding MYP in *Strongylocentrotus nudus*

1.4 cDNA 测序及分析

用扩增产物直接测序,拼接得到 MYP cDNA 序列全长。以引物 1F、4F、5F、R3、1R、3R 对片段 1 测序,以引物 M13-47、F1、2F、3F 对片段 2 进行测序(引物序列见表 1,测序方案见图 1)。用 Bioedit 7.0 分析软件对所得序列进行整理和翻译。序列已提交 GenBank (Accession number: DQ102372)。

1.5 MYP 进化分析

用 ClustalX 1.83 对所得序列与 NCBI 数据库中几种海胆的序列 (AY090112, AB097218, AB192414, AF318300, AY274929, AY026514, AY090113) 进行比对;用 Mega3.1 计算遗传距离,1000 次 Bootstrap 检验,分别用 Neighbor-joining 中的 Tamura-Nei 模型和 poisson correction 模型自举检验 1000 次计算进化关系,构建进化树。

2 结果

2.1 产物检测

总 RNA 的提取及 PCR 产物检测结果如图 2,两个样品所提 RNA 一致,取样品 1 的 RNA。片段 1 是引物 F4 和 R3 的扩增产物,片段 2 是 F6 和 R2 的扩增产物。 M_1 是 DL2000 Marker, M_2 是 λ -Hind III DNA Marker (图 3)。

2.2 光棘球海胆 MYP cDNA 核苷酸及推导氨基酸全序列

扩增得到的片段 1 与片段 2 的测序结果进行拼接得到的 cDNA 全长,共 4061 bp,其中 ORF 长 4047 bp,编码 1349 个氨基酸。核苷酸及编码区氨基酸序列如图 4 所示。

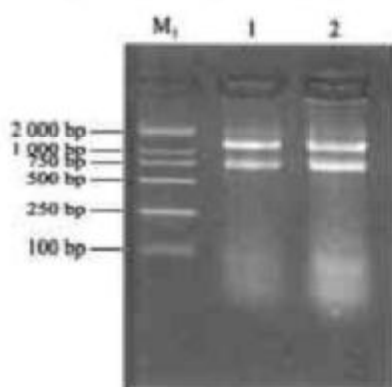


图2 样品总 RNA

M1:DL2000 marker; 1,2:样品编号

Fig.2 Electrophoresis of total RNA

M1:DL2000 marker; 1 and 2:sample No.

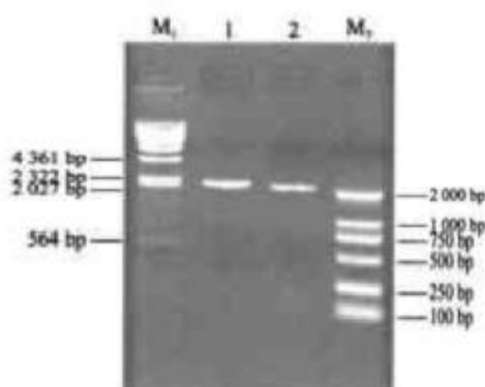


图3 LA PCR 扩增产物

M1:DL2000 marker; M2: λ -Hind III DNA marker; 1:片段 1,引物 F4 和 R3 的扩增产物(表 1);2:片段 2,引物 F6 和 R2 的扩增产物(表 1)

Fig.3 Amplification fragments by LA PCR

M1:DL2000 marker; M2: λ -Hind III DNA marker; 1:Fragment 1, the product of primers F4 and R3 (Tab.1); 2:Fragment 2, the product of primers F6 and R2 (Tab.1)

图4 光棘球海胆 MYP cDNA 序列及推导的氨基酸序列

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

2.3 几种海胆 MYP 氨基酸序列差异

通过对已知的 8 种海胆的 MYP 的氨基酸序列分析可以看出,海胆的 MYP 具有高度的同源性。在 1364 个位点中,共有 753 个相同位点,611 个位

点有变化。其中光棘球海胆与中间球海胆、紫球海胆、马粪海胆、红海胆有 1136 个位点是一致的。变异位点如图 5 所示。

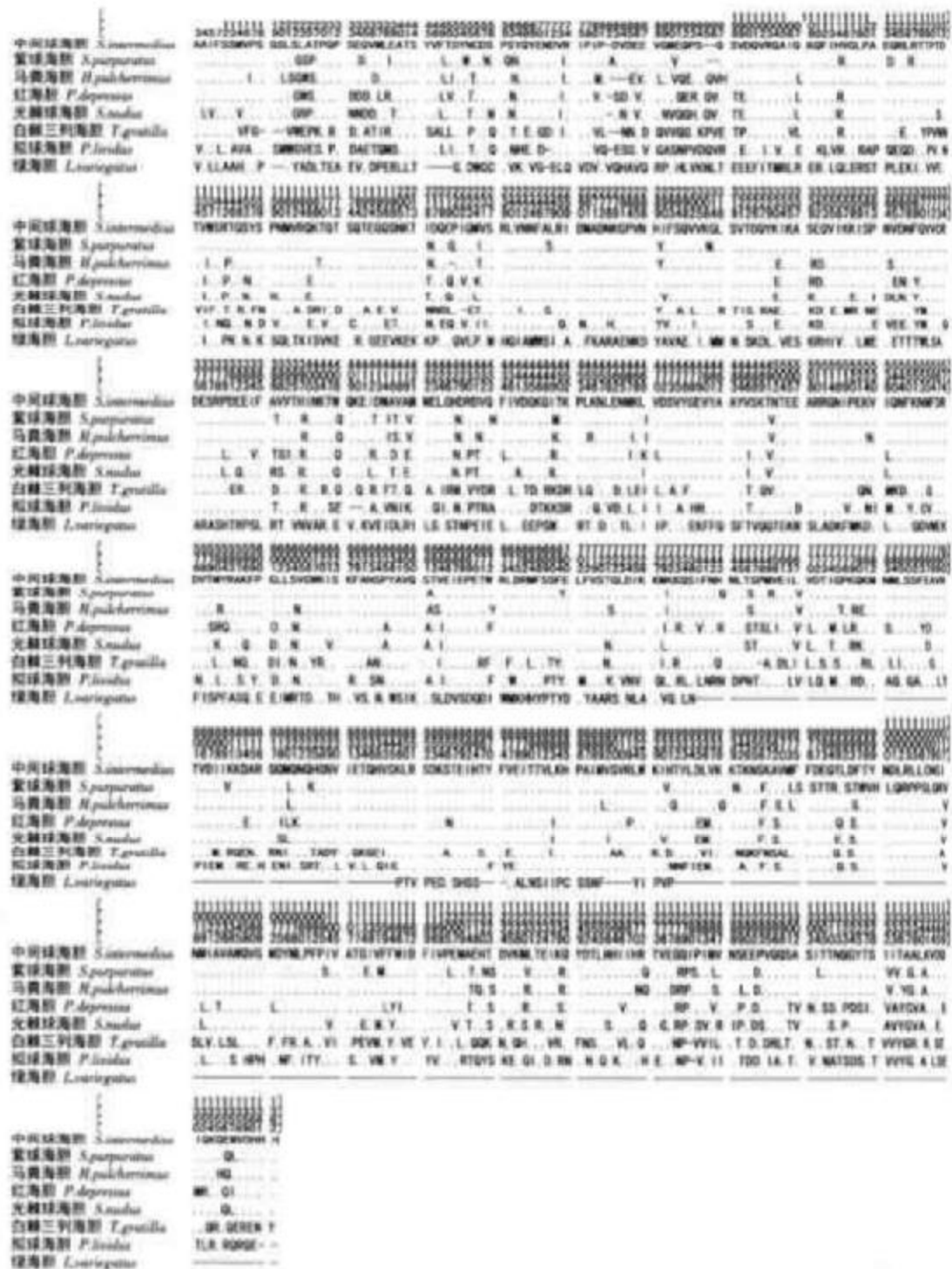


图 5 8 种海胆 MYP cDNA 推导的氨基酸序列差异

Fig.5 Sequence difference of amino acid translation of MYP cDNA from eight sea urchin

2.4 系统进化分析

将光棘球海胆与已知海胆的 MYP cDNA 及推导的氨基酸序列比对分析,计算遗传距离和构建进化树。结果表明,光棘球海胆 MYP cDNA 及氨基酸序列与其他几种海胆相比不存在重要序列差异。光棘球海胆核苷酸与氨基酸的系统发生树是一致的(图6、图7)。核苷酸水平上的遗传距离更近一些。

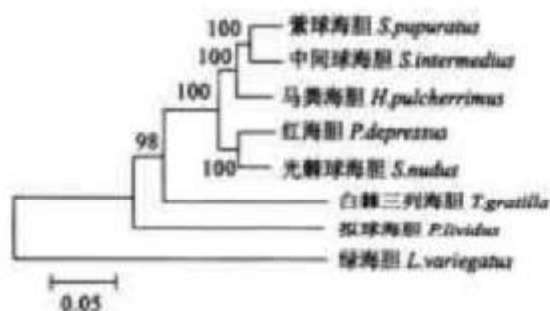


图6 8种海胆 MYP cDNA 系统发生树

根据核苷酸变异距离模型(Tamura-Nei),采用 Mega 3.1 中的 NJ 法构建进化树,1 000 次重复检验

Fig.6 MYP cDNA phylogenetic tree of eight sea urchins. Based on the neighbor joining algorithm using the Tamura-Nei model of Mega3.1. Results of 1 000 bootstrap test

光棘球海胆与红海胆的遗传距离(氨基酸水平)最近,为 0.069 ± 0.01 ,与同科的马粪海胆、紫球海胆、中间球海胆的遗传距离分别是 0.095 ± 0.012 、 0.098 ± 0.011 和 0.101 ± 0.012 。与白棘三列海胆、拟球海胆及绿海胆的遗传距离分别为 0.216 ± 0.017 、 0.218 ± 0.018 和 0.535 ± 0.028 。

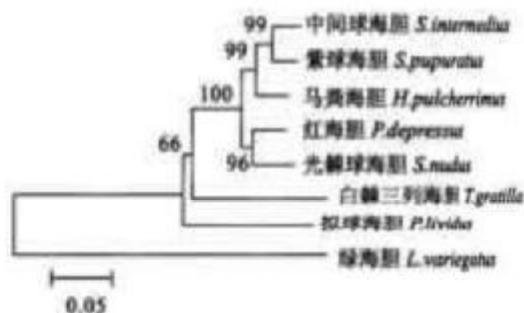


图7 8种海胆 MYP 氨基酸系统发生树

根据氨基酸变异距离模型(poisson correction),采用 Mega 3.1 中的 NJ 法构建进化树,1 000 次重复检验

Fig.7 Phylogenetic tree of amino acid deduced by MYP cDNA of eight sea urchins

Based on the neighbor joining algorithm using the poisson correction model of Mega3.1. Results of 1 000 bootstrap test

3 讨论

3.1 光棘球海胆与其他海胆的分类地位

光棘球海胆在传统分类学上属于棘皮动物门(Echinodermata),海胆纲(Echinoidea),正形目(Centrochinoida),球海胆科(Strongylocentrotidae)^[21]。MYP cDNA 及其推导的氨基酸进化关系表明,光棘球海胆与球海胆科的其他两种海胆中间球海胆及紫球海胆并没有聚在一起。而与毒棘海胆科(Toxopneustidae)的红海胆关系最近。同时红海胆与毒棘海胆科的另外两种海胆白棘三列海胆、绿海胆距离较远(遗传距离分别为 0.210 ± 0.017 、 0.530 ± 0.027)。这与 Matsuoka^[22]的研究结果是一致的。Matsuoka 用 15 种同工酶检验球海胆科与毒棘海胆科 7 种海胆之间的关系。结果表明,红海胆与球海胆科的种类关系更近,并认为它是球海胆科中的一员,与中间球海胆、光棘球海胆、马粪海胆在上新世有共同的祖先。从图 6、图 7 的进化关系还可以看出,光棘球海胆与同科的其他两种海胆属于不同的分支,这与 Lee^[23]的研究结果是一致的。Lee 通过

线粒体 DNA 序列的 12S rDNA (349 nt), 12S rDNA-tRNA (gln) 区(862 nt)及细胞色素氧化酶 I (COI, 1 080 nt)与 NADH 脱氢酶(NDI, 742 nt)的结合区研究了 8 种已知海胆的系统进化关系。结果表明,球海胆科至少包括两个主要的分支,一支是加州红海胆(*S. franciscanus*)和光棘球海胆;另一支是紫球海胆、中间球海胆、北方球海胆(*S. droebachiensis*)和马粪海胆。由此可见分子系统进化的研究与传统的分类学存在一定的差异。

3.2 光棘球海胆主要卵黄蛋白基因的特点及功能

海胆 MYP cDNA 序列对获得完整的 MYP 基因及研究 MYP 基因的功能具有重要意义。MYP 在历史上曾经被划分到 Vg 一类,研究认为 MYP 在配子形成、胚胎发育生理过程中担当重要的角色。Unuma^[24]研究了 MYP 在该海胆卵巢和精巢不同的发育时期的数量变化,在配子形成前 MYP 达到雌雄生殖腺湿重的 9%,总蛋白的 80%,认为 MYP 在雌雄配子形成前作为蛋白积累,用做配子合成所需要新物质的原料。Brooks 等^[20]将紫球海胆 MYP cDNA 编码的氨基酸序列以及绿海胆 MYP cDNA

编码的部分氨基酸序列与已知的其他动物的数据进行了比对,研究认为 MYP 是铁结合蛋白,它能输送铁到卵巢和精巢满足卵子和精子发育的需要。并对其形成的机制和作用做了进一步的研究。Brooks 等^[13]通过荧光标记 MYP 的方法研究了海胆卵子发生的卵黄形成阶段卵黄的运输、胞饮作用和包装作用的动力学。当 MYP 被移入雌性成熟个体的体腔,首先被卵巢的体细胞积累然后运输到卵母细胞并包装到卵黄小板中。研究结果表明,所有的卵黄小板都能接收卵子发生时新卵黄的输入。Brooks 等^[25]通过荧光标记的方式,研究了卵母细胞对卵黄蛋白 MYP 的胞饮作用动力机制。尽管同源性比较表明海胆的 MYP 基因与其他动物的卵黄蛋白基因有很大的差别,详细的功能目前还没完全研究清楚,但是通过对各种海胆 MYP 基因序列的研究使人们有可能在一段时间内搞清海胆 MYP 的确切功能。同时了解更多种类海胆的 MYP 基因序列对研究各种海胆之间的进化关系也十分重要,光棘球海胆 MYP 基因亦是如此。目前,本课题正对 MYP 基因在性腺不同发育时期的表达情况进行研究。

参考文献:

- [1] Wallace R A, Mialovin Z. Long-term growth and differentiation of *Xenopus* oocytes in a defined medium[J]. Cell Biol, 1978, 75: 5 534 - 5 538.
- [2] Kimble J, Sharrock W. Tissue-specific synthesis of yolk proteins in *Gammarus* [J]. Devel Biol, 1983, 96: 189 - 196.
- [3] Sharrock W J. Cleavage of two yolk proteins from a precursor in *Gammarus* [J]. Molec Biol, 1984, 174: 419 - 431.
- [4] Byrne B M, Gruber M. The evolution of egg yolk proteins[J]. Prog Biophys Molec Biol, 1989, 53: 33 - 69.
- [5] Chen J S, Seppington T W, Raikhel A S. Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry [J]. Molec Evol, 1997, 44: 440 - 451.
- [6] Bowens M. Why is there sequence similarity between insect yolk proteins and vertebrate lipases? [J]. Lipid Research, 1992, 33: 777 - 790.
- [7] Harrington F E, Easton D P. A putative precursor to the major yolk protein of the sea urchin [J]. Devel Biol, 1982, 94: 505 - 508.
- [8] Kari B E, Rottmann W L. Analysis of changes in a yolk glycoprotein complex in the developing sea urchin embryo [J]. Devel Biol, 1985, 108: 18 - 25.
- [9] Yokota Y, Kato K H. Degradation of yolk proteins in sea urchin eggs and embryos [J]. Cell Different, 1988, 23: 191 - 200.
- [10] Scott L B, Lennarz W J. Structure of a major yolk glycoprotein and its processing pathway by limited proteolysis are conserved in echinoids [J]. Devel Biol, 1989, 132: 91 - 102.
- [11] Shyu A B, Raff R A, Blumenthal T. Expression of the vitellogenin gene in female and male sea urchin [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(11): 3 865 - 3 869.
- [12] Unuma T, Suzuki T, Kurokawa T, et al. A protein identical to the yolk protein is stored in the testis in male red sea urchin, *Pseudocentrotus depressus* [J]. Biol Bull, 1998, 194: 92 - 97.
- [13] Brooks J M, Wessel G M. Selective transport and packaging of the major yolk protein in the sea urchin [J]. Devel Biol, 2003, 261: 353 - 370.
- [14] Ichio I, Deguchi K, Kawashima S, et al. Water-soluble lipoproteins from yolk granules in sea urchin eggs. I. Isolation and general properties [J]. Biochemistry, 1978, 84: 737 - 749.
- [15] Kari B E, Rottmann W L. Analysis of the yolk glycoproteins of the sea urchin embryo [J]. Cell Biol, 1980, 87: 144.
- [16] Onuki H. Yolk proteins of the sand dollar *Dendraster excentricus* [J]. Devel Growth Different, 1980, 22: 365 - 372.
- [17] Shyu A B, Blumenthal T, Raff R. A single gene encoding vitellogenin in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*: sequence at the 5' end [J]. Nucleic Acids Research, 1987, 15 (24): 10 405 - 10 417.
- [18] Unuma T, Okamoto H, Konishi K, et al. Cloning of cDNA encoding vitellogenin and its expression in red urchin, *Pseudocentrotus depressus* [J]. Zoological Science, 2001, 18: 559 - 565.
- [19] Yokota Y, Unuma T, Moriyama A. Cleavage site of a major yolk protein (MYP) determined by cDNA isolation and amino acid sequencing in sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* [J]. Compar Biochem Physiol Part B, 2003, 135: 71 - 81.
- [20] Brooks J M, Wessel G M. The major yolk protein in sea urchin is a transferrin-like, Iron Binding Protein [J]. Devel Biol, 2002, 245: 1 - 12.
- [21] 张凤藻, 廖玉麟, 吴宝特. 中国动物图谱. 棘皮动物分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1964. 74 - 101.
- [22] Matsuoka N. Biochemical study on the taxonomic situation of the sea-urchin, *Pseudocentrotus depressus* [J]. Zool Sci, 1987, 4: 339 - 347.
- [23] Youn-Ho Lee. Molecular phylogenies and divergence times of sea urchin species of Strongylocentrotidae, Echinoida [J]. Molec Biol and Evol, 2003, 20(8): 1 211 - 1 221.
- [24] Unuma T, Yamamoto T, Akiyama T, et al. Quantitative changes in yolk protein and other components in the ovary and testis of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus* [J]. Experim Biol, 2003, 206: 365 - 372.
- [25] Brooks J M, Wessel G M. The major yolk protein of sea urchin is endocytosed by a dynamin-dependent mechanism [J]. Biol Reprod, 2004, 71: 705 - 713.

Analysis of cDNA encoding major yolk protein (MYP) in sea urchin *Strongylocentrotus nudus*

ZHOU Zun-chun^{1,2}, BAO Zhen-min¹, DONG Ying², HE Chong-bo², HAN Jia-bo², WANG Li-mei²

(1. Department of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Key Laboratory of Ocean and Fishery Molecular Biology, Open Laboratory of Applied Marine Biology, Dalian 116023, China)

Abstract: Major yolk protein (MYP) is found in both sexes of sea urchins where it is presumed to play a physiological role in gametogenesis, embryogenesis, or both. Some studies demonstrate that MYP is a transferrin-like, iron binding protein and one of MYP's transferrin-like properties is to shuttle iron to developing germ cells. Although the precise functions of MYP are not clear, MYP is necessary for the reproduction of sea urchins. To learn the cDNA sequence encoding MYP of sea urchin is very important for the advanced research on the function and phylogenesis of MYP gene. The overall sequence of cDNA encoding MYP of *Strongylocentrotus nudus* was determined by amplifying and sequencing. The template RNA was extracted from gonad of mature sea urchin, and the primers were designed based on the known cDNA of other sea urchins (AB097218, AB192414, AY090112) on NCBI database. The strategy of amplification is Long and Accurate (LA) PCR. Two overlapped fragments covering the full-length cDNA were amplified and sequenced. The full-length cDNA sequence was obtained by joining the two fragments together. The full-length cDNA amplified is 4 067 bp and the nucleotide sequence contains an open reading frame (ORF) of 4 047 bp encoding 1 349 amino acids. The obtained nucleotide sequence and also the deduced amino acids were compared with nucleotide and amino acids sequence of other species of sea urchins accumulated on the NCBI database (AY090112, AB097218, AB192414, AF318300, AY274929, AY026514, AY090113) using ClustalX1.83. Genetic distances were computed, and phylogenetic trees were constructed using Mega3.01. The results indicate that the nucleotide and deduced amino acids sequences of MYP cDNA in *Strongylocentrotus nudus* show high homology with other seven species of sea urchins. The relationship between *Strongylocentrotus nudus* and *Pseudocentrotus depressus* is close at the level of amino acids, and the genetic distance is 0.069 ± 0.01 . The genetic distances between *Strongylocentrotus nudus* and other three species of sea urchins (*Hemicentrotus pulcherrimus*, *Strongylocentrotus purpuratus*, *Strongylocentrotus intermedius*) in the same family are 0.095 ± 0.012 , 0.098 ± 0.011 and 0.101 ± 0.012 , respectively. The relationships between *Strongylocentrotus nudus* and *Triplaneustes gratilla*, *Paracentrotus lividus*, *Lytichinus variegatus* are correspondingly far, and the genetic distances are 0.216 ± 0.017 , 0.218 ± 0.017 and 0.535 ± 0.028 , respectively. The MYP cDNA sequence obtained of *Strongylocentrotus nudus* provides the bases for advanced research on the function and phylogenesis of MYP gene. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3): 352–359]

Key words: *Strongylocentrotus nudus*; major yolk protein (MYP) cDNA; sequence analysis

Corresponding author: BAO Zhen-min. E-mail: zmbao@ouc.edu.cn