

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.01123

半滑舌鳎 Dorsalin-1-like 基因的克隆与表达

马骞, 庄志猛, 柳淑芳, 唐启升

山东省渔业资源与生态环境重点实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

摘要: Dorsalin-1 是骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)家族成员, 在调控脊椎动物神经系统的发育中具有重要作用。目前, 国内外有关脊椎动物 Dorsalin-1 的研究报道十分有限。本研究克隆了半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) Dorsalin-1-like 基因的 cDNA 序列, 并分析了 Dorsalin-1-like mRNA 在半滑舌鳎成鱼的组织表达差异及其在早期发育阶段的表达水平变化。研究结果表明, 半滑舌鳎 Dorsalin-1-like 基因 cDNA 全长为 1 961 bp, 包括了 153 bp 的 5'非翻译区(5'UTR)、编码 419 个氨基酸的 1 260 bp 的开放读码框(ORF), 以及 548 bp 的 3'非翻译区(3'UTR)。同源性分析和分子进化聚类分析结果显示, 半滑舌鳎 Dorsalin-1-like 与红鳍东方鲀(*Tafileugu rubripes*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)等的同源性最高, 并与之共同聚为鱼类 Dorsalin-1 分支。此外, Dorsalin-1-like mRNA 在半滑舌鳎成鱼的 13 个组织中具有广泛的分布, 并在心脏组织中表达量最高, 在肝、脊髓等组织中次之。在半滑舌鳎早期发育阶段(卵期、仔鱼、稚鱼、幼鱼)中, Dorsalin-1-like 在卵期中的胚胎期表达量最高, 其次为前期仔鱼期。上述实验结果表明, Dorsalin-1 在调控卵期和仔鱼期的早期发育中具有重要作用, 并可能通过调节神经系统的发育进而参与心脏、骨骼等组织的发育调控。本研究旨在揭示 Dorsalin-1-like 基因在调控半滑舌鳎早期神经系统发育的重要作用, 并为筛选半滑舌鳎骨骼发育的调控因子奠定理论基础。

关键词: 半滑舌鳎; Dorsalin-1-like; mRNA 表达; 早期发育; 骨骼发育; 神经系统

中图分类号: S91

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)06-1123-09

鲽形目鱼类作为真骨鱼类的特化群, 其体型特征扁平, 两眼同位一侧, 另侧无眼。半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther, 1873)是鲽形目重要代表种之一, 也是黄渤海的名贵鱼种和理想的增殖对象^[1]。与其他鲆鲽鱼类相似, 半滑舌鳎在从胚后仔鱼发育成长为稚鱼期间都会经历一个特殊的变态发育过程。在这个过程中, 鱼体外形上从两侧对称发育为两侧不对称, 鱼体游动方式由侧卧转变为平卧。伴随着外部形态与游泳方式的改变, 其骨骼形态和位置亦发生显著变化。可见, 骨骼的发生、发育对半滑舌鳎的早期发育具有重要的作用。

据报道, 脊椎动物骨骼的形成多受骨形态发生

蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)的调控。BMPs 属转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族, 是一类能单独诱导骨形成的酸性蛋白, 具有调节骨细胞核成骨细胞的分化、促进骨愈合、控制骨骼不同形态特征形成的功能^[2]。由于 BMPs 是目前唯一能诱导异位成骨的细胞因子, 自发现以来一直是成骨研究领域的热点。然而, 在目前已发现的 30 余种 BMP 家族成员中, 仅有 BMP2、BMP6、BMP7 等 7 种蛋白具有诱导骨形成的作用, 其成骨活性在临床医学研究中也发挥了重要的作用^[3-5]。越来越多的研究表明, BMP 家族成员的生物学作用不仅限于诱导成骨, 这些活性因子也参与调控

收稿日期: 2013-04-23; 修订日期: 2013-06-14.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201981); 中国水产科学研究院黄海水产研究所级基本科研业务费资助项目(20603022012032).

作者简介: 马骞(1983-), 女, 博士, 研究方向为渔业资源分子生态学. E-mail: maqian@ysfri.ac.cn

通信作者: 庄志猛, 研究员, 研究方向为渔业资源分子生态学. E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3446.S.20130926.1540.002.htm>

网络出版时间: 2013-09-26 15:40

心血管、胃肠、呼吸、泌尿生殖、体被及神经系统的胚胎发育、生长和分化, 是一组多功能的生长因子^[6]。

最新研究表明, 骨骼的发育受到植物性神经系统的控制, 即脊椎动物神经系统的发育与骨骼的发育密切相关^[7]。由此可见, BMP 家族成员作为多功能的生长因子, 可能通过调节神经系统等多种组织器官的发育进而调控骨骼的发育。其中, BMP 家族中的 Dorsalin-1 在调控胚胎发育过程中神经系统的发育中具有重要作用^[8]。例如, Dorsalin-1 在鸡背神经管中的表达能够在原肠胚期诱导神经嵴细胞的形成^[9-10]。然而, 有关 Dorsalin-1 参与调控骨骼发育的研究鲜有报道。因此, 本研究选取 Dorsalin-1 基因作为研究对象, 克隆半滑舌鲷 Dorsalin-1-like cDNA 序列、分析其组织表达分布特征, 并进一步检测 Dorsalin-1-like mRNA 在早期发育阶段(卵期、仔鱼期、稚鱼期和幼鱼期)的表达水平变化, 以期揭示 Dorsalin-1-like 基因在调控半滑舌鲷早期神经系

统发育的重要作用, 并为筛选半滑舌鲷骨骼发育的调控因子奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

基因克隆和组织表达检测用半滑舌鲷取自山东莱州明波水产养殖有限公司, 取健康 3 龄鱼 12 尾(雌、雄鱼各 6 尾), 其体长与体质量等信息见表 1。解剖并分别取其脑、吻软骨、背鳍、鳃、性腺、心脏、肠、肾、肝、肌肉、脾、脊髓及胃共计 13 个组织。立即将样品投入液氮中速冻后, 在低温状态下转移至-80℃超低温冰箱中保存待用。此外, 根据陈大刚^[11]和万瑞景等^[12]对半滑舌鲷等鱼类早期发育阶段的划分标准, 选取用于早期发育阶段 Dorsalin-1-like 基因表达水平分析用的半滑舌鲷样品(表 2)。上述样品均保存于液氮中用于后续总 RNA 的提取。

表 1 半滑舌鲷成鱼样品信息
Tab. 1 Mature *Cynoglossus semilaevis* samples

样品 sample	数量/尾 numbers of individuals	年龄/a age	体长/mm body length	体质量/g mean body weight
雌鱼 female	6	3	583.0 ± 61.3	1479.2 ± 280.8
雄鱼 male	6	3	333.3 ± 14.3	170.3 ± 16.9

表 2 早期发育阶段半滑舌鲷样品信息
Tab. 2 *Cynoglossus semilaevis* samples in the early developmental stages

取样信息 sampling information	卵期 egg stage				仔鱼期 larval stage		稚鱼期 juvenile stage	幼鱼期 fingerling stage
	卵裂期 cleavage stage	原肠期 gastrula stage	胚胎期 embryonic stage	孵化期 hatching stage	前期仔鱼 early-stage larvae	后期仔鱼 late-stage larvae		
取样时间 sampling time	3 h	13 h	22 h	32h	1 d, 2 d	3d, 4 d, 5 d, 10 d	20 d, 30 d, 40 d, 50 d	90 d
取样数量/ind sampling number	20	20	20	20	6	6	6	6

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 数据库中已有的其他鱼类 Dorsalin-1-like cDNA 序列, 遵循引物设计原则, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计基因特异性引物 Dorsalin-1-F 和 Dorsalin-1-R(表 3), 用于扩增 Dorsalin-1-like 基因的部分序列。随后, 基于上述 Dorsalin-1-like cDNA 部分序列分别设计

用于 3'和 5'RACE 扩增实验所需的的引物(Dorsalin-1-3'-OUTER/INNER 和 Dorsalin-1-5'-OUTER/INNER)。此外, 根据克隆到的半滑舌鲷 Dorsalin-1-like cDNA 序列设计用于实时荧光定量 PCR 检测的引物(Dorsalin-1-RT-F/R)。

1.2.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成 将半滑舌鲷成鱼的各组织样品和不同发育阶段的

表 3 本研究所用的引物序列
Tab. 3 Oligonucleotide primers used in this study

引物名称 name of primer	引物序列(5'-3') primer sequences (5'-3')	应用 amplification target
Dorsalin-1-F Dorsalin-1-R	CTCAAGGTCAACTTCAAAGACAT GGTACATGACCGTGATGGGGT	Dorsalin-1 部分序列扩增 cDNA fragment of Dorsalin-1
Dorsalin-1-5'-OUTER Dorsalin-1-5'-INNER	AGAGTCTGGATGAGGGCGTGTTGGA CAGCGGTTGGTAACAAAGACCTCGGC	5' RACE 扩增 5' RACE amplification
Dorsalin-1-3'-OUTER Dorsalin-1-3'-INNER	GGTCAACTTCAAAGACATTGGCTG ACATGGCTTGTTGTGTCCCAAT	3' RACE 扩增 3' RACE amplification
Dorsalin-1-RT-F Dorsalin-1-RT-R	GACATTGGCTGGGACAGTTGG GTCTGGATGAGGGCGTGTTAG	Dorsalin-1 的荧光定量 PCR 检测 expression of Dorsalin-1
EF1A-F EF1A-R	GACAAACTGAAGGCHGAGCG CAGCCTGAGAGGTTCCAGTGAT	Dorsalin-1 组织表达分布的内参 expression of EF1A
18S-F 18S-R	CCTGAGAAACGGCTACCACATCC CCAATTACAGGGCCTCGAAAG	早期发育阶段 Dorsalin-1 表达水平检测的内参 expression of 18S

全鱼样品在液氮中研磨后, 利用 Trizol 法(Invitrogen)提取总 RNA。经检测浓度和纯度, 以提取的总 RNA 为模板, 利用 PrimeScript RTase 试剂盒(Takara)合成第一链 cDNA。

1.2.3 Dorsalin-1-like 基因 cDNA 全序列的克隆 首先, 利用上述引物 Dorsalin-1-F/R, 以半滑舌鲷第一链 cDNA 为模板, 扩增 Dorsalin-1-like cDNA 的部分序列。PCR 反应体系为 25 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。RACE 扩增选取 SMARTer RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech), 用于扩增半滑舌鲷 Dorsalin-1-like 基因的 cDNA 全序列。PCR 反应体系及反应条件按试剂盒说明操作。上述 PCR 产物经回收纯化、连接、转化与重组子检测等, 送华大基因测序。

1.2.4 Dorsalin-1-like mRNA 的组织分布及其在不同发育阶段的表达水平检测 应用实时荧光定量 PCR 的方法, 利用基因特异性引物 Dorsalin-1-RT-F/R(表 3), 以半滑舌鲷第一链 cDNA 为模板, 以本实验室前期筛选的延伸因子(elongation factor 1-alpha, EF1A)作为内参检测 Dorsalin-1-like mRNA 在半滑舌鲷成鱼的组织分布, 以 18S 核糖体 DNA(18S ribosomal RNA, 18S)基因作为内参检测 Dorsalin-1-like mRNA 在半滑舌鲷不同发育阶段的表达变化(未发表)。实验流程参照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒(TaKaRa)操作说明, 在

ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪上进行。所有引物均经过扩增效率检测($E > 90\%$; $R^2 > 0.990$), 荧光定量 PCR 产物经测序验证, 每个样品设置 3 个重复。

1.2.5 序列分析及数据处理 DNA 和推定的氨基酸序列使用 EditSeq 和 DNAMAN 软件进行分析; 使用 NCBI 中的 BLAST 和 DNASTAR 软件, 分析半滑舌鲷与其他脊椎动物的 Dorsalin-1 等 BMP 家族基因的氨基酸序列的同源性差异; 推测的半滑舌鲷 Dorsalin-1-like 基因氨基酸序列用 ClustalX 软件与其他物种的 BMP 家族基因序列进行多重序列比对; 基于 Neighbor-Joining (NJ)方法用 MEGA5.1 构建系统进化树, 针对拓扑树各分支结点均进行重抽样检验, 各重复 1 000 次^[13]。根据荧光实时定量 PCR 测得的 C_t 值, 运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 Dorsalin-1-like 基因在半滑舌鲷的 mRNA 表达模式。本研究所有结果均以平均值 $\pm$ 标准误差(mean $\pm$ SE)表示, 并利用 SPSS 16.0 软件中的 one-way ANOVA 分析 Dorsalin-1-like mRNA 表达量在各发育阶段间差异显著水平。

2 结果与分析

2.1 Dorsalin-1-like 基因全长 cDNA 的克隆和序列分析

利用上述的一对特异性引物 Dorsalin-1-F 和 Dorsalin-1-R, 从半滑舌鲷 cDNA 中扩增得到了

224 bp 的扩增产物, 测序后经 BLAST 比对分析, 确定该片段为 Dorsalin-1-like 基因蛋白编码区的部分序列。根据所得到的基因序列分别设计合成用于扩增 cDNA 5'和 3'端的基因特异引物, 进行 Dorsalin-1-like 基因的 5'和 3'端 RACE 扩增, 并分别得到了 1 342 bp 和 822 bp 的特异性条带, 所得序列经克隆测序及 BLAST 比对分析确认其为 Dorsalin-1-like 的 5'和 3'端序列。通过对 3 条序列片段进行拼接, 得到了半滑舌鲷 Dorsalin-1-like 基因的全长 cDNA 序列。

半滑舌鲷 Dorsalin-1-like 基因 cDNA 全长为 1 961 bp, 包括了 153 bp 的 5'非翻译区(5'UTR)、1 260 bp 的开放读码框(ORF)以及 548 bp 的 3'非翻译区(3'UTR), 其中 3'UTR 区含有脊椎动物典型的多腺苷酸化加尾信号 AATAAA (图 1)。半滑舌鲷 Dorsalin-1-like 基因编码 419 个氨基酸, 包含由 24 个氨基酸组成的信号肽区域和 395 个氨基酸组成的成熟肽。预测 Dorsalin-1-like 分子量为 46.72 kD, 等电点(pI)为 5.65。通过对半滑舌鲷 Dorsalin-1-like 氨基酸序列进行 BLAST 比对, 结果显示其与 Transforming growth factor-beta (TGF-beta)家族成员具有极其相似且完整的保守区, 属于转化生长因子 β 超家族。此外, 半滑舌鲷 Dorsalin-1-like 基因在 C 端成熟肽区域还具有 BMP 家族成员共有的 7 个半胱氨酸残基(图 1)。

2.2 Dorsalin-1-like 基因的系统进化分析

经 BLASTX 比对和 DNASTAR 软件分析发现, 半滑舌鲷 Dorsalin-1-like 氨基酸序列与已报道的其他脊椎动物的 Dorsalin-1 和骨形态发生蛋白 10(BMP10)氨基酸序列均具有较高的同源性。同源性分析结果表明, 半滑舌鲷与已报道的其他物种的 Dorsalin-1 氨基酸序列相似性在 30.8%~69.0% (表 4)。其中, 与红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*) Dorsalin-1-like 氨基酸的同源性最高(69.0%), 与斑胸草雀(*Taeniopygia guttata*)Dorsalin-1-like 氨基酸的同源性最低(52.6%)。而半滑舌鲷 Dorsalin-1-like 和其他脊椎动物 BMP10 的氨基酸序列相似性在 28.4%~32.7%。此外, 半滑舌鲷 Dorsalin-1-like 与其他脊椎动物 Dorsalin-1 的遗传

距离也低于与 BMP10 的遗传距离, 分别为 0.307~1.025 和 0.962~1.055。

在半滑舌鲷与其他物种 Dorsalin-1 和 BMP10 氨基酸序列同源性比对分析的基础上, 利用 NJ 法进行了分子进化树聚类分析。如图 2 所示, 已报道的脊椎动物 BMP10 聚为一支, 而 Dorsalin-1 分为主要的两个分支独立于 BMP10 分支之外。其中, 一支是由高等脊椎动物 Dorsalin-1 和 Dorsalin-1-like 组成, 另外一支为鱼类 Dorsalin-1-like 分支。在上述分析结果中, 鱼类的 Dorsalin-1 和 BMP10 分支均独立于对应的其他脊椎动物分支之外。

2.3 Dorsalin-1-like mRNA 的组织表达分布及其在早期发育阶段的表达水平

利用实时荧光定量 PCR 技术检测半滑舌鲷成鱼 Dorsalin-1-like mRNA 的组织表达分布。结果表明, Dorsalin-1-like mRNA 具有广泛的组织分布特性, 并在心脏组织中表达量最高; 其次在肝、脊髓、肌肉有中等水平的表达; 在胃和肠组织中有微弱表达(图 3)。半滑舌鲷心脏中 Dorsalin-1-like 的 mRNA 表达水平可达胃、肠组织的 59 倍。

如图 4 所示, Dorsalin-1-like mRNA 在半滑舌鲷早期发育阶段的表达水平总体呈现先升高后降低的趋势。其中, Dorsalin-1-like mRNA 在胚胎发育阶段的后期和前期仔鱼期具有较高水平的表达量。在半滑舌鲷卵期中, Dorsalin-1-like mRNA 在胚胎期的表达量达到卵裂期的 10.7 倍。这一阶段是 Dorsalin-1-like 表达量在各早期发育阶段中的最大值, 其次分别为 2 日龄和 1 日龄的前期仔鱼阶段。而从后期仔鱼期开始, Dorsalin-1-like 的表达量在 1.09 ± 0.44 的范围内上下波动。差异显著性分析结果表明, Dorsalin-1-like mRNA 在卵期、仔鱼期、稚鱼期和幼鱼期这 4 个早期发育阶段中的表达水平无显著差异。

3 讨论

近年来, 有关脊椎动物 BMP 家族的研究取得了显著的进展。已有研究表明, BMPs 是结构类似且高度保守的一类功能蛋白质家族, 其家族成员

1 acatggggggagcatgggagcgacatcaggactgctgtgtctgtctgaggagaaactcca
61 ttccaaacacctgccaccgcgaagtctgttttcacactgagaagaaggtaagttctggc
121 catitttggaatttcaaataggatcgaaactcgagATGCTGAGCTCCAGAGCGTTTCTGTG
1 M L S S R A F L L
181 CGGGTGTGTTTGAAGTCTGGCCGTGTACAGCGGTCACGACCTGTAAACCTCTCAGTAAT
10 R V C L S L A V Y S G S T C K P L S N
241 GACGTGGAAGTCAGGACCCCGAGGGATTAGACATTCAGCTGTACAGCATGATCTACTG
30 D V E S Q D P E G L D I Q L S D D D L L
301 GAGAAGGAAGACGTGGACATGAGGATGGAGAACCTCCTTGGGAACATGAAGGAGGGCTTT
50 E K E D V D M R M E N L L G N M K E G F
361 TTGAAAAAACTCAACCTGTGAGATGTTTCTCAGGAGCAGACGAAGATGTCTCCTCCTCAG
70 L K K L N L S D V P Q E H S K M S P P G
421 TTCATGTGGAAGTTTACAACAAGTATGCTGACAGCCGCTCCACCGCCCTCAGTCGGAT
90 F M M E L Y N K Y A A D R S T S P Q S D
481 GTCATAAGAAGCTTCTCTGTTCAAGATTTACCATCTCTTTAATCAATGGCACAAGACA
110 V I R S F S V Q D F T I S L I N G T K T
541 AAGCACAGGCTGCAGTTCAACGTCACCATCCCCAGTCATGAGAAGATTGTACATCTGAA
130 K H R L Q F N V T I P S H E K I V T S E
601 CTCAGCTCTTCTTTTCCAGACAACAGTCAATAACCTCTCAAAGTCAATAGTCAAA
150 L Q L F F F P D N T S I T S S K S I V K
661 GTCCACGAGGTGGGTACAAATTTGACTTCTACGACCTACTCGAGGGCAAAGAGGTGACC
170 V H E V G H N L T S T T L L E G K E V T
721 AGTTCTCATGGTGTGTGGGCTCATTTGACGTGACTGCAGCAGTTGAGGGCTGGTCGAGG
190 S S H G V W A S F D V T A A V E G W S R
781 TCAGGTGCGGTGCAACTGTTTACAGCTCGTGGTGGACAGGAAGATTGTGTAGCTCT
210 S G C G A T V L D V V D R K D C V A P
841 CCAGGTGGAGATGAAGCAGCAGGATGTTTGAATGTGAGCCTGTGCGTTGGAGGAAACACC
230 P G G D E A A G C L N V S L S V G G N T
901 TCAGCAGCTGTGATTGTGTTCTCAGATGACCTGAGCAGCAGGAGGCAGGAGAACAAGAAG
250 S A A V I V F S D D L S S R R Q E N K K
961 GAGCTCAGGGAGATGATCCACCGTGAGGAAGAAGCCATCCTGCACCTCAGGCGCTGACTGG
270 E L R E M I H R E E A I L H S G A D W
1021 AACAGAGGGGGAGATCTGCCAAACGAAATCCTGGAAGCTCAACATCCACGGAGAACCAAA
290 N R G G D L P N E I L E A Q H P R R T K
1081 AGAAAGGCCAGTGGGAGGGAGTACTGCCGGCGGACCTCACTCAAAGTCAACTCAAGGAC
310 R K A S G R E Y [] R R T S L K V N F K D
1141 ATTGGCTGGGACAGTTGGATTGTGGCTCCTCCAGAATATGACGCCTATGAATGCCGAGGT
330 I G W D S S W I V A P P E Y D A Y E [] R G
1201 CTTTGTACCACCCGCTGACGGATGAGTCCACCCCATCAAAACGCCCTCATCCAGACT
350 L [] Y H P L T D E S T P S K H A L I Q T
1261 CTGATCAACATCAGGGACCCCGGGAAGCCAACATGGCTTGTGTGTCCCAATTAAGT
370 L I N I R D P G K A N M A [] [] V P I K L
1321 GACCCCATCAGGTATGTATCAAGAGAATGGACGTCTCACTATAAGATATCTGTACGAG
390 D P I T V M Y Q E N G R L T I R Y L Y E
1381 GAGATGAAGGTGGCAGAGTGGGGTGCAGGTAGttggagggttggttggagtaaatagta
410 E M K A A A E [] G [] R *
1441 taagtataaaagaataaaataaagtgaacgttaaagagatacataaaaaatatttc
1501 taatttgtactttaagttggctgactcttggatccatgcatggatacacatagatact
1561 gacacatgccatgcagaccttattaacaattagcactagaaattagcaagaagaatgatg
1621 tgcataaatgggtgcataggaatttagatatatttatgttactgttaggettgaagaaagac
1681 attgagacaccagagacacaaaaaacaacaaatgtgcacttcctgttagaggcagaagt
1741 aaatcagtcacagtttccaaatagaacatttgtttaaaaaactactgcagaccaaaagctg
1801 acagttttagtaaagtgcaatttgttttatgggtgtttctgtcctactctactataaaaac
1861 tagcaaaatgtcgcaatgtgaataaagttagcatttttacctattttagctattttagc
1921 ataataaactgtgacttgtatgtgcagttacataataaagctgaaaaaaaaaaaa

图 1 半滑舌鳎 Dorsalin-1-like 基因及推定的氨基酸序列

5'UTR 和 3'UTR 用小写字母列出, 信号肽序列用下划线标出, 加尾信号(aataaa)用粗体标出, poly(A)尾巴用双下划线标出。黑色框标记半胱氨酸残基, 终止密码子用星号标出。

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Cynoglossus semilaevis* Dorsalin-1-like gene

The lowercases indicate the 5'UTR and 3'UTR, the signal peptide is underlined, the AATAAA sequence that indicates the polyadenylation signal is bold, and the poly(A) signal sequence is double underlined. Cys residues are boxed. The stop codon is marked by an asterisk.

表 4 已报道的脊椎动物 Dorsalin-1 和 BMP10 氨基酸序列来源及同源性比较
Tab. 4 Amino acid identity of *Cynoglossus semilaevis* Dorsalin-1-like with corresponding published sequences

基因 gene	种名 species	GenBank 登录号 GenBank access. no.	半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	
			同源性/% identity	遗传距离 pairwise distance
Dorsalin-1-like	半滑舌鳎	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	KC422337	
	红鳍东方鲀	<i>Takifugu rubripes</i>	XP_003961584	69.0
	尼罗罗非鱼	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003438592	67.5
	火鸡	<i>Meleagris gallopavo</i>	XP_003208056	32.9
	斑胸草雀	<i>Taeniopygia guttata</i>	XP_004174850	30.8
Dorsalin-1	原鸡	<i>Gallus gallus</i>	AAA48752	32.7
	原鸽	<i>Columba livia</i>	EMC87355	32.5
bone morphogenetic protein 10	原鸡	<i>Gallus gallus</i>	XP_417667	32.7
	原鸽	<i>Columba livia</i>	EMC87216	32.7
	普通狨	<i>Callithrix jacchus</i>	XP_002757713	32.5
	东非狨	<i>Papio anubis</i>	XP_003908804	32.2
	亚马逊松鼠猴	<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>	XP_003922717	32.2
	普通猕猴	<i>Macaca mulatta</i>	XP_001096299	32.2
	白颊长臂猿	<i>Nomascus leucogenys</i>	XP_003262538	32.0
	大猩猩	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	XP_004029400	32.0
	智人	<i>Homo sapiens</i>	NP_055297	31.7
	小家鼠	<i>Mus musculus</i>	NP_033886	31.0
	斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	NP_001124072	28.9
bone morphogenetic protein 10-like	红鳍东方鲀	<i>Takifugu rubripes</i>	XP_003974763	32.7
	尼罗罗非鱼	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003448668	30.5
	青鳉	<i>Oryzias latipes</i>	XP_004072919	28.4

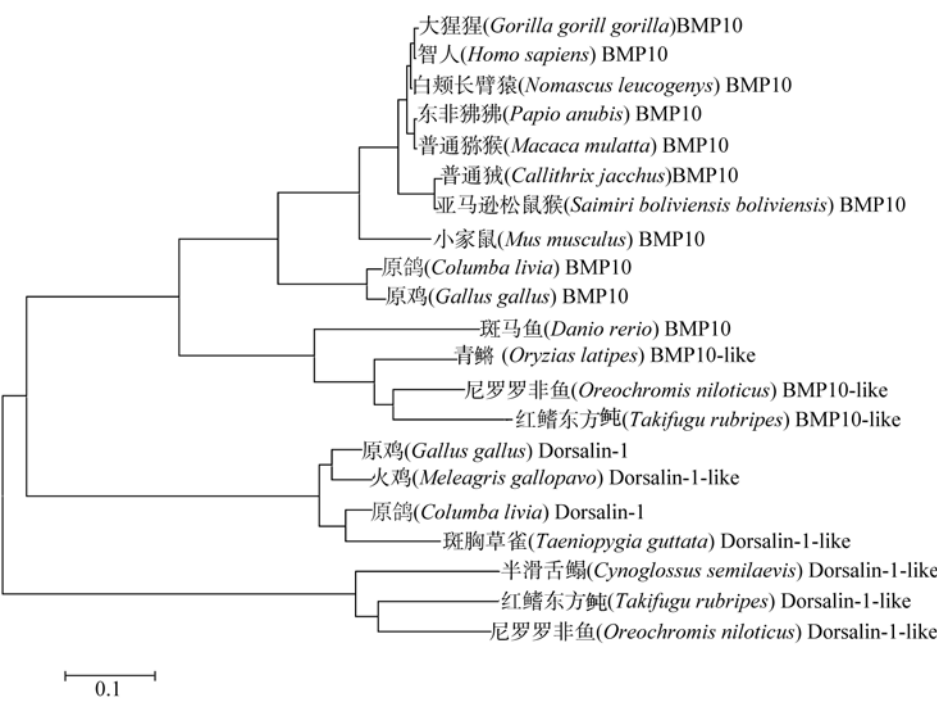


图 2 基于 Dorsalin-1 和 BMP10 基因序列构建的系统进化树(NJ 树)
Fig. 2 Phylogenetic tree of Dorsalin-1 and BMP10 sequences based on Neighbor-Joining (NJ) method

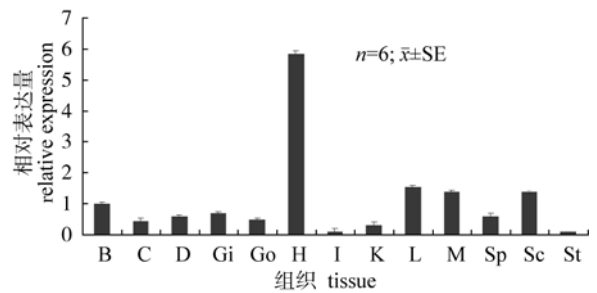


图 3 半滑舌鳎 Dorsalin-1-like mRNA 的组织表达分布
B: 脑; C: 吻软骨; D: 背鳍; Gi: 鳃; Go: 性腺; H: 心脏; I: 肠;
K: 肾; L: 肝; M: 肌肉; Sp: 脾; Sc: 脊髓; St: 胃。
Fig. 3 Expression of Dorsalin-1-like mRNA in various tissues of *Cynoglossus semilaevis*
B: brain; C: cartilage; D: dorsal fin; Gi: gill; Go: gonad; H: heart; I: intestine; K: kidney; L: liver; M: muscle; Sp: spleen; Sc: spinal cord; St: stomach.

在 C 端具有一个高度保守的结构域, 内含 7 个结构稳定的半胱氨酸。这些半胱氨酸可以两两形成 3 个二硫键相连, 用以维持蛋白的正常折叠和空间结构的稳定^[5, 14-15]。半滑舌鳎 Dorsalin-1-like 基因在多肽序列的 C 末端也同样存在 7 个保守的半胱氨酸残基, 表明本研究获得的 Dorsalin-1-like 基因符合 BMP 家族成员的共有特征。此外, 与其他 TGF- β 超家族成员类似, 脊椎动物的 Dorsalin-1-like 基因在多肽序列 N 端区域的保守性较低^[9]。

目前, 已报道的脊椎动物 Dorsalin-1 基因序列信息十分有限。而序列比对分析结果显示, 本研究克隆的半滑舌鳎 Dorsalin-1-like 氨基酸序列与其他脊椎动物的 Dorsalin-1 和 BMP10 氨基酸序

列均具有较高的同源性。因此, 本研究开展了脊椎动物 Dorsalin-1 和 BMP10 的系统进化分析, 进化树显示的分子进化关系与传统的形态学和 BMP 家族的分类情况基本一致。上述研究结果从基因结构和分子系统进化两个方面验证了半滑舌鳎 Dorsalin-1-like 序列的准确性, 并为揭示 Dorsalin-1 基因在鱼类早期发育阶段的调控作用奠定基础。

鱼类早期发育阶段通常划分为卵期、仔鱼期、稚鱼期和幼鱼期 4 个发育时期, 这几个时期是鱼类数量最大, 死亡最多, 也是鱼类数量变化率最高的敏感时期^[11, 16]。因此, 阐明鱼类早期发育的调控机制, 是认识鱼类早期发育阶段的功能趋向及环境适应的切入点, 也是优化和创新鱼类繁育技术的基础^[17]。据报道, BMPs 在脊椎动物的早期发育阶段、尤其是胚胎期具有重要的调节作用。大量遗传学实验证明 BMPs 参与了胚胎发生早期中机体轮廓的形成及组织类型和轴心的确定, 并在随后的器官发生阶段诱导不同部位骨骼结构和支撑连接组织的形成。并且多种 BMPs 在胚胎发育过程中均有较高水平的表达, 且其表达量和表达的部位会随着发育过程发生改变^[18-19]。在本研究中, 半滑舌鳎 Dorsalin-1-like mRNA 在早期发育阶段的各个时期均有表达, 且其 mRNA 在卵期中的胚胎期表达水平最高, 在前期仔鱼期次之。推测其原因, 可能是鱼类的胚胎期包括了从尾芽形成到心脏开始跳动的发育过程, 而在此期间,

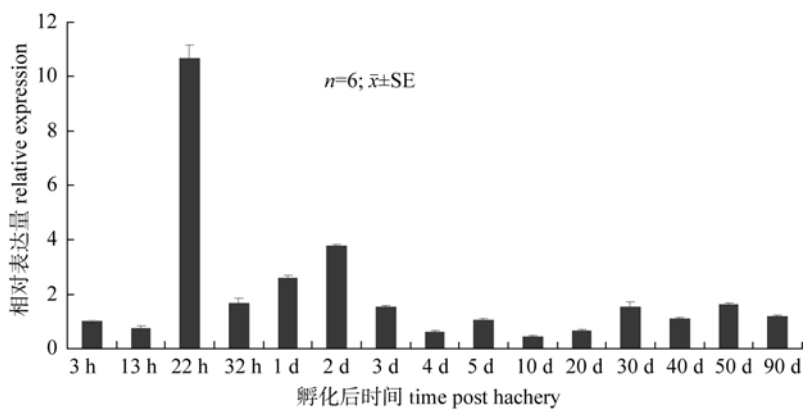


图 4 Dorsalin-1-like mRNA 在半滑舌鳎早期发育阶段的表达水平
Fig. 4 Dorsalin-1-like mRNA expression level in early developmental stages of *Cynoglossus semilaevis*

Dorsalin-1-like 极有可能参与调控半滑舌鳎主要器官系统原基的分离和组织结构的分化^[11]。

最新研究表明,骨骼的发育受到植物性神经系统的控制,并且这一大脑到骨骼的神经通路同样控制着心率^[7]。可见在早期胚胎发育过程中,神经系统、心脏、骨骼等的发育过程密切相关。而 Dorsalin-1 作为 BMP 家族成员,可能通过调节神经系统的发育进而参与鱼类心脏、骨骼发育的调控。因而半滑舌鳎 Dorsalin-1-like 在胚胎期的高水平表达可能是由于神经系统与心脏发育具有相关性,而在这一阶段胚胎的心脏开始跳动,从而需要较高水平的 Dorsalin-1-like mRNA 表达。尽管此后 Dorsalin-1-like 表达水平降低,但与后期仔鱼、稚鱼和幼鱼期相比,其 mRNA 表达量仍处于较高的表达量以维持半滑舌鳎早期发育的需要。

BMP 家族成员依据结构和进化分析可分为 5 个亚类,其中, BMP9、BMP10 和 Dorsalin-1 同属于其中一个亚类^[20]。BMP10 在调控脊椎动物心脏发育中具有重要作用,并且 BMP10 mRNA 在心脏组织中具有较高水平的表达^[21-22]。目前,有关 Dorsalin-1 的研究主要集中在对神经系统发育的调控作用,而 Dorsalin-1 在调节脊椎动物心脏、骨骼等组织发育的研究则鲜有报道。本研究中 Dorsalin-1-like mRNA 在半滑舌鳎成鱼的心脏中的表达水平显著高于其他组织,且定量 PCR 产物测序结果亦证明了所得序列为 Dorsalin-1-like 基因而并非 BMP10 基因,揭示了 Dorsalin-1-like 可作为研究心脏发育调控的潜在因子。此外,半滑舌鳎 Dorsalin-1-like 在脑、脊髓中较高的表达水平也验证了其在调节神经系统发育中的重要作用。

参考文献:

- [1] 邓景耀, 孟田湘, 任胜民. 渤海鱼类种类组成及数量分布[J]. 海洋水产研究, 1988 (9): 11-89.
- [2] Koenig B B, Cook J S, Wolsing D H, et al. Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells[J]. Molec Cell Biol, 1994, 14(9): 5961-5974.
- [3] Hongwei C, Wei J, Frank M, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs)[J]. J Bone Joint Surg (Am), 2003, 85(8): 1544-1552.
- [4] Kang Q, Sun M H, Cheng H, et al. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery[J]. Gene Ther, 2004, 11(17): 1312-1320.
- [5] Ducy P, Karsenty G. The family of bone morphogenetic proteins[J]. Kid Intern, 2000, 57(6): 2207-2214.
- [6] 顾羊林, 杨开舜. 骨形态发生蛋白研究新进展[J]. 临床外科杂志, 2008, 16(10): 709-711.
- [7] Bajayo A, Bar A, Denes A, et al. Skeletal parasympathetic innervation communicates central IL-1 signals regulating bone mass accrual[J]. Proc Nat Acad Sci, 2012, 109(38): 15455-15460.
- [8] Baker C V, Bronner-Fraser M. The origins of the neural crest. Part I: embryonic induction[J]. Mechan Devel, 1997, 69(1): 3-11.
- [9] Basler K, Edlund T, Jessell T M, et al. Control of cell pattern in the neural tube: Regulation of cell differentiation by dorsalin-1, a novel TGF β family member[J]. Cell, 1993, 73(4): 687-702.
- [10] Liem Jr K F, Tremml G, Roelink H, et al. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm[J]. Cell, 1995, 82(6): 969-979.
- [11] 陈大刚. 黄渤海渔业生态学[M]. 北京: 海洋出版社, 1991: 35-40.
- [12] 万瑞景, 姜言伟, 庄志猛. 半滑舌鳎早期形态及发育特征[J]. 动物学报, 2004, 50(1): 91-102.
- [13] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molec Biol Evol, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [14] Daopin S, Piez K A, Ogawa Y, et al. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily[J]. Science, 1992, 257(5068): 369-373.
- [15] Rissi M, Wittbrodt J, Délot E, et al. Zebrafish Radar: A new member of the TGF- β superfamily defines dorsal regions of the neural plate and the embryonic retina[J]. Mech Dev, 1995, 49(3): 223-234.
- [16] Blaxter J H S, Ehrlich K F. Change in Behaviour during Starvation of Herring and Plaice Larvae[C]//Early Life Hist Fish, Scotland: Springer Berlin Heidelberg, 1974: 575-588.
- [17] Keith P, Hoareau T B, Lord C, et al. Characterisation of post-larval to juvenile stages, metamorphosis and recruitment of an amphidromous goby, *Sicyopterus lagocephalus* (Pallas)

- (Teleostei : Gobiidae : Sicydiinae)[J]. Mar Freshw Res, 2008, 59(10): 876–889.
- [18] Marom K, Levy V, Pillemer G, et al. Temporal analysis of the early BMP functions identifies distinct anti-organizer and mesoderm patterning phases[J]. Dev Biol, 2005, 282(2): 442–454.
- [19] Danesh S M, Villasenor A, Chong D, et al. BMP and BMP receptor expression during murine organogenesis[J]. Gene Expr Patt, 2009, 9(5): 255–265.
- [20] Kurogi Y, Ohta K, Nakazawa T, et al. Cloning, sequencing of bone morphogenetic protein from sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*[J]. DNA Seq, 2007, 18(2): 112–119.
- [21] Chen H, Shi S, Acosta L, et al. BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis[J]. Development, 2004, 131(9): 2219–2231.
- [22] Somi S, Buffing A A M, Moorman A F M, et al. Expression of bone morphogenetic protein-10 mRNA during chicken heart development[J]. Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology, 2004, 279(1): 579–582.

Molecular cloning and expression analysis of Dorsalin-1-like gene in the tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)

MA Qian, ZHUANG Zhimeng, LIU Shufang, TANG Qisheng

Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: As a member of the bone morphogenetic protein (BMP) family, Dorsalin-1 plays an important role in regulating the development of the nervous system. To date, studies involving the vertebrate Dorsalin-1 has thus far only rarely been reported. In this study, molecular cloning and expression analysis of Dorsalin-1 gene were performed in the tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). As a result, the Dorsalin-1-like cDNA sequence is 1 961 bp, which contains a 5'-untranslated region (UTR) of 153 bp, an open reading frame (ORF) of 1 260 bp encoding a protein of 419 amino acids, and a 3'-untranslated region (UTR) of 548 bp. The homology and phylogenetic analysis revealed that the deduced amino acid sequence of *C. semilaevis* Dorsalin-1-like gene exhibited the highest identity with those of *Takifugu rubripes* and *Oreochromis niloticus*, and the fish Dorsalin-1 formed a single lineage from the other vertebrates. The tissue expression distribution pattern of Dorsalin-1-like gene was examined in the 13 tissues of female and male adults. The results showed that the Dorsalin-1-like mRNA was predominantly expressed in heart, and less expressed in the liver and spinal cord. Finally, the Dorsalin-1-like mRNA levels at early developmental stages were also detected at egg, larva, juvenile and fingerling stages. The highest level was observed in the embryonic stage (egg stage) and early-stage larvae (larva stage). These findings suggest that Dorsalin-1 may play an important role in regulating early development of the egg and larva stages, and maybe involved in the heart and skeletal development through the regulation of the nervous system.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; Dorsalin-1-like; mRNA expression; early development; skeleton growth; nervous system

Corresponding author: ZHUANG Zhimeng. E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn