

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15147

建鲤基因组中一个 *ty3-gypsy* 反转录转座子的发现与分析

丁炜东, 曹丽萍, 曹哲明, 邴旭文

农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081

摘要: 转座子是动植物基因组的重要组成部分, 在前期研究中发现建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)基因组中存在一个 *ty3-gypsy* 反转录转座子类型的转座子, 并将其命名为 *JRE* 转座子(Jian carp Retrotransposon, *JRE*)。为了研究 *JRE* 反转录转座子在建鲤基因组中的功能, 采用 PCR 扩增、荧光定量 PCR 和原位杂交等方法对 *JRE* 转座子的特性进行了研究。*JRE* 反转录转座子全长 5126 bp, 具有 5'端 470 bp 和 3'端 453 bp 长末端重复片段(long terminal repeat end, LTR), 中间的开放阅读框(ORF)包括核心蛋白基因(*gag*)和酶基因区域(*pol*), 其长度为 4203 bp。*pol* 基因具有典型的 *ty3-gypsy* 反转录转座子结构, 基因顺序为 *PR-RT-RH-IN* 基因。对 *pol* 基因的同源分析表明, 其与虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、栉孔扇贝(*Azumapecten farreri*)、大堡礁海绵(*Xiphophorus maculatus*)和斑剑尾鱼(*Xiphophorus maculatus*)*pol* 基因相似性分别为 40.7%、40.0%、32.8%和 30.1%, 因此 *JRE* 可能属于 *JULE* 反转录转座子家族。采用实时定量 PCR 对 *JRE* 转座子在建鲤基因组内的拷贝数进行了测定, 结果表明其拷贝数为 124, 同时对不同组织中的 mRNA 表达量的研究表明, *JRE* 转座子在建鲤肝、肾、血、肌肉、性腺 5 种组织中均有表达, 在肾和肝中表达量略高。染色体原位杂交结果表明, *JRE* 转座子在建鲤的染色体上随机分布, 没有明显的规律性。本研究表明, *JRE* 转座子具有典型的反转录转座子结构, 属于 *JULE* 转座子的分枝, 在染色体上的分布不多, 其转录活性并不是很高, 对我们了解建鲤基因组构成和特点增加了知识储备, 同时为利用转座子的活性进行转基因研究提供了一种新的途径和工具。

关键词: 建鲤; 反转录转座子; 拷贝数; 原位杂交

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)02-0284-13

DNA 转座子(transposon)是一类能在真核生物染色体上不断移动位置的功能性 DNA 片段, 对发现新基因和分析基因功能具有重要的作用, 被认为是导致真核生物遗传变异的主要原因之一^[1]。转座子作为插入突变原或分子标签已被广泛用于基因的分离和克隆^[2-3], 一些甚至可作为转化载体用于转基因动植物的制备。*piggyBac* 转座子在果蝇(*Bactrocera tryoni*)^[4]、家蚕(*Bombyx mori*)^[5]等昆虫中, 能作为一个高效、稳健的载体进行转基因研究, 并促进生殖种系转化。家禽上也有报道

利用 *mariner* 转座元件可实现转基因鸡的制备^[6]。而在秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*)中发现的 *Tc3* 转座元件则已经成功转化斑马鱼(*Danio rerio*)^[7]。根据转座方式的不同, 转座子可分为 DNA 转座子和反转录转座子(retrotransposon)。其中, 反转录转座子是指以 RNA 为中介, 反转录成 DNA 后进行转座的可动元件, 亦被称为返座元(retroposon)。近几年的研究表明返座元是真核生物中最重要的一类转座元元件, 也是目前所知高等植物中数量最大的一类可活动遗传成分^[8]。按

收稿日期: 2015-04-10; 修订日期: 2015-07-21.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31200918); 江苏省自然科学基金项目(BK2011184); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2015JBFM06).

作者简介: 丁炜东(1977-), 男, 副研究员, 研究方向为鱼类遗传育种. E-mail: dingwd@126.com

通信作者: 曹丽萍, 助理研究员, Tel: 0510-85558876, E-mail: caolp@ffrc.cn;

邴旭文, 研究员, Tel: 0510-85558719, E-mail: bingxw@ffrc.cn

照序列结构中是否含有长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)又可分为 LTR 反转录转座子 and 无 LTR 反转录转座子。

LTR 反转录转座子主要由 2 个开放阅读框(open reading frames, ORFs)构成, 即核心蛋白基因(*gag*)和酶基因区域(*pol*)。*gag* 基因编码类似于 RNA 病毒颗粒反转录相关的蛋白, *pol* 基因编码逆转录过程中的主要蛋白, 包括蛋白酶(PR)、反转录酶(RT)、RNase H 和整合酶(INT)^[9-10]。RT 和 RNase H 是反转子复制、转座的关键酶, INT 主要作用是使反转录转座子插入到染色体中的新位点。由于 *pol* 基因同源性及 INT 蛋白的排列位置, LTR 反转录转座子又分为 *ty3-gypsy* 和 *ty1-copia* 两大类。LTR 反转录转座子采用的是“拷贝-复制”的机制, 在宿主基因中不断扩增; 由于返座元带有增强子、启动子等调控元件, 最终会参与到宿主基因的表达及新基因的产生等过程^[10]。目前在多种水生生物基因组中已经鉴定出一些 LTR 反转录转座子, 如斑马鱼、金鱼(*Carassius auratus*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)等^[11-12], 但在建鲤中并没有 LTR 转座子的报道。反转录转座子的这种插入导致产生变异的功能在鱼类重要性状相关基因的筛选^[13-14]、重要基因的功能研究以及转基因动物等方面有着重要的研究和运用前景。例如, *Tol2* 转座系统^[14-15]已经用于多种动物的转基因研究, 成功获得突变体, 如果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[15]、斑马鱼^[16]、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)^[17]、鸡(*Gallus gallus*)^[18]、小鼠(*Mus musculus*)^[19-20]等模式生物。

鲤鱼是中国境内分布范围最广的重要淡水经济鱼类之一。其养殖历史悠久, 品系繁多, 种群差异显著, 为鲤鱼常规选育种提供了极好的材料。但是, 与经济性状相关联的数量性状还无法与 DNA 分子遗传标记建立连锁关系, 没有足够的 DNA 分子遗传标记可利用, 使鲤鱼的选育种研究还停留在以性状选择为主的水平上, 从而导致鲤鱼选育种研究带有一定的局限性。建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)是以荷包红鲤(*Cyprinus carpio haematopterus*)和元江鲤(*cyprinus carpio yuanjiang*)为亲本, 运用

雌核发育、家系选育与系间杂交等人工育种方法相结合经多代选育获得的具有稳定遗传性状的养殖品种, 目前该品种在全国 27 个省市得以推广养殖, 具有生长速度快、体型佳和肉质好等优良性状^[21-22]。为此, 本研究以建鲤为实验对象, 从前期构建的建鲤基因组库中获得了一个完整的 *ty3-gypsy* 转座子序列, 经与已报道的其他转座子进行比对发现, 该反转录转座子是 *ty3-gypsy* 家族 JULE 亚群的一员, 我们命名其为 JRE (Jian Retrotransposon, JRE), 现采用定量 RT-PCR 等方法在建鲤基因组和不同组织中检测转座子的拷贝数和 RNA 表达量, 同时对 JRE 转座子的结构特点进行了分析, 从而加深对建鲤基因组进化的了解, 为日后通过反转录转座子标签研究鲤科鱼类基因的功能和调控, 以及分离克隆基因奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验鱼

建鲤为本实验室保存, 采集血液进行基因组 DNA 和不同组织 RNA 提取。

1.2 基因组 DNA 和 RNA 提取

采用大连宝生物工程有限公司 Whole Blood Genomic DNA Extraction Kit 提取建鲤基因组 DNA, 主要步骤如下: 取建鲤 5 尾, 尾静脉无菌采血, 采集的血液 10 μ L 使用含蛋白酶 K 和 RNase A 裂解液 56 $^{\circ}$ C 消化 15 min, 然后加入 200 μ L 100% 乙醇, 进行过柱纯化, 最后使用 elution buffer 洗脱与膜结合的 DNA, 采用琼脂糖凝胶电泳进行检验。用蒸馏水将 DNA 样品稀释备用, 其他样品保存到 -70 $^{\circ}$ C 备用。

采用 TaKaRa 公司 RNAiso Plus, 按照说明书提取肝等组织中的 RNA, 主要步骤如下: 将组织研磨粉碎后, 加入 700 μ L RNAiso Plus, 反复吸打至组织完全裂解后, 加入 1/5 氯仿, 室温静置 5 min, 离心取上清后, 加入等量无水异丙醇沉淀 RNA, 分光光度计测定吸光值, 保存到 -70 $^{\circ}$ C 备用。

1.3 分子系统学分析

采用 NIH 网站 BLAST 软件分析获得的 JRE 反转录转座子全长序列, 同时在 GenBank 中进行

比对, 下载氨基酸序列相似性较高的其他物种 ty3-gypsy 氨基酸序列, 使用 Clustal W 软件进行分析, 采用 neighbor-joining 构建系统进化树进行分析。进化树分析中所采用的序列为: *Amphimedon queenslandica* (XP-003390581.1), *Xiphophorus maculatus* (AF193865.), *Saccoglossus kowalevskii* (XP002732475.1), *Azumapecten farreri* (ABM90392), *Mizuhopecten yessoensis* (ABM90393), *Oreochromis niloticus* (XP_003460117), *Xenopus tropicalis* (XP_002935079.2), *Danio rerio* (AF503912), *Candidatus entotheonella* (ETW98900), *Clonorchis sinensis* (GAA49140)。

1.4 JRE 反转录转座子拷贝数评估

在使用荧光定量 PCR 进行 JRE 转座子拷贝数检测之前, 先通过普通 PCR 进行引物的特异性判定。PCR 产物首先用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 若电泳结果表明 PCR 扩增中产生引物二聚体, 则需要调整退火温度, 直至没有二聚体产生为止。最后按此最佳温度进行定量 PCR 检测。引物序列为, F1: 5'-AGAGCCTTGTTTCAGTTATCG-3', F2: 5'-CCAGTCAGGGTGT ATTTTGTC-3'。

采用 BIORAD 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 反应, 试剂为购自大连宝生物工程有限公司的 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq, 反应体系为: SYBR Premix Ex Taq 12.5 μ L, 引物 0.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, 灭菌水 9.5 μ L, 总体积 25 μ L。扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。所有实验重复 3 次, 同时在整个实验过程中均设置阴性对照, 从而排除假阳性结果。实验中的建鲤基因组模板 DNA 和转座子的质粒标准品都进行 10 倍梯度稀释, 用于定量分析。

1.5 转录子活性检测

采用实时定量 PCR 对建鲤肝、肾、血、肌肉、性腺 5 种组织中 JRE 转座子的活性进行检测。总 RNA 的抽提见 1.2。取 2 μ g 总 RNA 合成第一链 cDNA, 反应成分为: oligo dT 1 μ L, MMLV 反转录酶 0.5 μ L, dNTP 1 μ L, 缓冲液 4 μ L, RNase Inhibitor 1 μ L, 加水补至 20 μ L, 42 $^{\circ}$ C 温育 1 h 后, 冰浴冷却。同时设置阴性对照, 检测有无 DNA 污染。

设计针对 RT 基因的特异引物 JRC1: 5'-GAA GTTTTGGAAATGGGGGAG-3', JRC2: 5'-GTAAT AGGGGTACATGGGGC-3'。以 β -actin 基因作为参考基因, 相应的引物为 Actin-F: 5'-GTCAAGT CCGTTGAGATGCACC-3'和 Actin-R: 5'-GGATG ATGACCTGAGCATTGAAGC-3', JRE 转座子的表达量根据 β -actin 的表达量来进行计算。同时将这两个基因克隆转进 T 载体中, 经测序验证后, 其浓度经分光光度计进行测定。将含 JRE 转座子 RT 基因片段和 β -actin 基因的质粒梯度稀释后, 构建标准曲线, 最终用来计算 JRE 转座子表达量。平行实验重复 3 次, 所有样品都设置阴性对照, 从而排除假阳性。

1.6 荧光原位杂交(FISH)检测

探针的合成采用罗氏 PCR 探针标记试剂盒 (11636090910) 完成, 具体按照说明书操作。中期染色体的制备见曹丽萍等^[23]。原位杂交的方法参照罗氏原位杂交试剂盒 (11758888001) 说明书, 主要步骤如下:

1.6.1 染色体标本的准备 -80 $^{\circ}$ C 保存的染色体, 60 $^{\circ}$ C 烤片 2 h 后置于 37 $^{\circ}$ C 过夜; 杂交区滴加适量 RNase (100 μ g/mL, 溶于 2 $\times$ SSC 中), 37 $^{\circ}$ C, 水浴 1 h; 2 $\times$ SSC 室温洗涤后, 依次经过 70%、85%、90% 和 100% 乙醇脱水, 室温晾干; 杂交区滴加适量胃蛋白酶 (0.01%, 溶于 0.01 mol/L HCl 中), 37 $^{\circ}$ C, 水浴 10 min; PBS 和 PBS (含 50 mmol/L MgCl₂) 依次洗涤后, PBS (含 50 mmol/L MgCl₂ 和 1% 甲醛) 处理后修复, 再依次经过 70%、85%、90% 和 100% 乙醇脱水, 室温晾干。

1.6.2 原位杂交 杂交区滴加杂交液, 杂交液总体积为 20 μ L, 将探针杂交液 (含 50% 去离子甲酰胺, 2 $\times$ SSC, 10% 硫酸葡聚糖, 50 mmol/L 磷酸钠, 2.5 ng 已标记的转座子 JRE DNA 探针) 于 80 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冰浴 10 min; 加盖盖玻片, 置湿盒中避光, 37 $^{\circ}$ C, 杂交过夜。

1.6.3 洗脱及荧光检测 杂交后的片子放入 2 $\times$ SSC (50% 甲酰胺) 和 2 $\times$ SSC 溶液中, 45 $^{\circ}$ C, 充分洗涤; Blocking solution (Roche 公司) 封闭后滴加 AP 偶联的抗地高辛抗体 (Roche 公司), 于 37 $^{\circ}$ C 温育

60 min, Washing buffer 和 Detection buffer (Roche 公司)分别洗涤 3 次, 每次 5 min; 最后加入 HNPP/Fast Red TR Mix, 20℃温育 30 min, 此过程重复 2 次, 每次反应之间 Washing buffer (Roche 公司)漂洗 1 次, 每次 10 min; DDW 浸泡 10 min 终止反应, 滴加 20 μL DAPI (0.02 mg/mL)复染后封片, 即可在荧光显微镜下观察。

1.6.4 图像检测及分析 染色体制片在避光的条件下, 用 Olympus BX51 荧光显微镜观察杂交信号, 利用 Applied Spectral Imaging FISH view 5.5 软件(Applied Spectral Imaging, Inc, USA)控制的 SenSysCCD 相机捕获图像。

1.7 数据统计分析

实验结果采用 SPSS 15.0 进行分析, 数据均作单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 结构特点

为获得序列的全长, 我们进行了至少 4 个克隆的重复测序, 测序结果表明我们获得了转座子的全长, 通过 BLASTX 搜索 GenBank 分析和 Staden Package 1.6 软件中的重复序列分析工具证实了该 *JRE* 转座子具有 *LTR* 反转录转座子的经典结构(图 1), 包含 gag 蛋白和 pol 蛋白结构域的编码序列。其中 pol 结构域的基因顺序为 *PR-RT-RH-IN*, 因而该转座子属于 *ty3-gypsy* 类型^[24]。*JRE* 一共由 5126 bp 核苷酸构成, 包括 470 bp 5'端 *LTR*, 4203 bp ORF 和 453 bp 3'端 *LTR*。整个 ORF 编码 1401 个氨基酸, 5'端 *LTR* 和 3'端 *LTR* 具有 2

个倒转重复的边界序列 TG...CA。*JRE* 转座子两边是以 ATCTT 为边界的正向重复。*LTR* 具有以 *TGT* 开始、以 *ACA* 结束的典型反向重复序列区, 在 *LTR* 中也发现了多嘌呤位点, 如位于 203 bp 处的 AAAGGAGGTAA^[25], 在 5'端 *LTR* 中具有与 ser-tRNA 3'端互补的 PBS 序列。

根据 *JRE* 中间区域的 *RT*、*RH* 和 *IN* 基因推测的氨基酸序列进行了系统分析, 采用 Clustal W 软件进行序列比对, 蛋白序列比对见图 2, *JRE* 转座子与虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*) 具有 40.7%的相似性。*JRE* 的 gag 蛋白、RT、IN 均分别拥有长末端反转录转座子中相应蛋白质的结构域模式^[26-28]。gag 蛋白含有两个锌指蛋白结构域, 分别为 CX₂CX₄HX₄C 和 CX₂CX₃HX₄C^[29], 推测它们在 RNA 结合中起着重要的作用。PR 蛋白中含有 DTG 和 LLG 结构域^[30-31], 类似于逆转录病毒中的天门冬氨酸蛋白酶活性裂解位点。RT 结构域中包含了 6 个保守区域, 而 IN 蛋白含有保守的亚结构域: HHCC 锌指模式^[32], 中间区域的 DD₃₅E 模式^[33]。

2.2 分子系统学分析

采用 BLAST 程序对 *JRE* 转座子进行分析表明, 其转座子 RT 酶与虾夷扇贝、栉孔扇贝(*Azumapecten farreri*)、大堡礁海绵(*Amphimedon queenslandice*)和斑剑尾鱼(*Xiphophorus maculatus*)RT 酶氨基酸分子相似性分别为 40.7%、40.0%、32.8% 和 30.1%, 然而在核苷酸水平上的相似性却很低, 其原因是序列中存在一些简并密码子或者沉默突变。将 *JRE* 序列与下载的 *Ty3/gypsy* 转座子序列

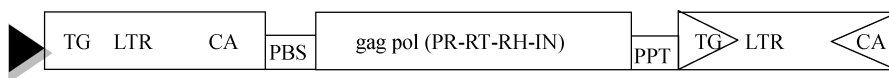


图 1 *JRE* 转座子结构图

开放阅读框以长方形表示; 2 个三角形表示反向重复序列(TG...CA); gag, 核心蛋白; pol, 酶基因相关蛋白; PR, 蛋白酶; RT, 反转录酶; RH, RNase H; IN, 整合酶; PBS, PPT 分别表示引物结合位置和多聚嘌呤位置; 黑色三角形表示反转座中复制时的起点位置(ATCTT)。

Fig. 1 Schematic representations of *JRE* elements

Open reading frames (ORF) are boxed; two triangles in LTR boxes showed inverted repeats (TG...CA) at the end of LTR. gag, group-specific antigen; pol, polyprotein; PR, protease; RT, reverse transcriptase; RH, RNase H; IN, integrase; 5' bp (ATCTT) target site direct duplication region (TSD) caused by retrotransposition is indicated by black triangle.

JRE	MAMTFGKVVA-DLSQGETWC-----GEHTVATTANIGGAGTKRATRAILLCASVTCCGA	53
Mizuhopecten	MTSTFGKIDAFDDSQGETWEHYTERLGQYFVANGIGNEEPGDKEKRRAILLS-----V	53
JULE	MAMHVGRVVQYDESK-EYFESYLERLEQWMLANDVP-----DEKVVCTFLS-----V	46
Oreochromis	MAMHVGRVEEYNESK-EDFESYLERLEQWMLANNVS-----DEKKVCTFLS-----V	46
	: .: : *: * : : :*: . . . :*. .	
JRE	TGCKVYKCTCLMSCGATTGCCATCAGCETACCGDLSATCTPTKPACGSEKTYTTCEDLVV	113
Mizuhopecten	CGAKVYK---LMS-----DLSAPTKP-----SEKTY---EDLVV	81
JULE	IGADTYG---LLK-----NLVSPKVP-----STMET---AAL	72
Oreochromis	IGADTYR---LLK-----NLVSPRVP-----STMGY---AAL	72
	... *: . :* :. * * * . :	
JRE	TGGTVKGTCTEHSATARPKPSACEIVTAATQRTAYKFHNRFRKTGESVSQFIAALRNLS	172
Mizuhopecten	L-----VKEHSA---PKP-----SEIVQR---YKFHNRFRKTGESVSQFIAALRNLS	123
JULE	T-----AALQAHYKLT-----VVIAR---FRFQKRNQKEEPPVSDYVVALRQLSA	116
Oreochromis	T-----AALSAQYKPT-----VVIAR---FRFQKRNQKEGEAVSDYVVALRQLSA	116
	. * . * . :* :*: * * *.**:::***:**	
JRE	HCNFT-----TTTGCTGTLEACTMIRDRACTLVCG-----	203
Mizuhopecten	HCNFGGTLETMIRDRLVCGINEDRIQRRLSERELTFTKSYEIAISMETAANKVIDLQQD	183
JULE	TCNFGQYLDEALRDRFVSGLHSDAAQRKLLAEKDLTFSHACEIAVNMELASKNTMEFSGH	176
Oreochromis	TCDFGQYLDEALRDRFVSGLRSDAVQRKLLSEKDLTFPRACEIAVSMELASKNTMEFSGR	176
	: . * : : : * : .	
JRE	---TAGINEAATDRTCGIQORPKSQQTQGHR-----APDNQGNLQKPCFRCGGK	251
Mizuhopecten	TTPAGAGKIHKVSQPKRGQORPKSQQTQGHRA-----QAPDNQGNLQKPCFRCGGK	235
JULE	HDPIHQVNALTNPVPMFSKRGWKQHSKEGQNSKEEKHIQIKSWMGSKKDTATRQPCYRCGGK	236
Oreochromis	QDPHHVNALSNAFNFSNKGWRCQNRQEGNNKP-----KNRKGPKKDTGVKQPCYRCGGK	230
	. . . : : : : . . . : : :*:****	
JRE	HKPQNCFKDSECFYCRKKGHIIEKCLTRLAECKGGRVGACCTHSSDCTGRKKTCQNKTT	311
Mizuhopecten	HKPQNCFKDSECFYCRKKGHIIEKCLTRLAECKGGRV---THSSD---RKK---QNK---	284
JULE	HSARDCRFRNEQCHVCAKIGHIARACN-----KKSRSQQTQY	273
Oreochromis	HSARECKFKSEKCHVCAKIGHTARACN-----KKFSQQTQY	267
	.::*:*:*. * * ** . * . ** *:	
JRE	VNALGAEGREVDDATCCGTDDIYPCCTCMFRVSTASSNKTGAEPYTVAAATLSVGTATNGI	371
Mizuhopecten	VNAL---EEVDD---DDIYP---MFRVS---SSNK---EPYTVTLVS---NGI	319
JULE	VETDIEASNRNDEAELFG-----VYSVYSVASSE---KGYTLDVLLG-----	312
Oreochromis	LETEDECSSRNDEAELFG-----VYSMYSITSSE---KGYTVDVALG-----	306
	::: . *: : : :*: : **: :	
JRE	PLQCGMEIDTGASKTVVCTTCGEPTAFERKCTTDKVTTCETLKPTCTCSNGAGKKPTTY	431
Mizuhopecten	PLQ---MEIDTGASKTVVG---EP---AFERLTCKDKVT---LKP---SNTKLKTY	360

(图 2 待续 Fig. 2 to be continued)

(续图 2 Fig. 2 continued)

Jule	DKNTTMLLDTGSAVSVIS-----DKYYQSHLTQFP--IKPVG-----LKLKSY	353
Oreochromis	NKNTTMLLDTGSAVSVS-----DKYYQMHLTHFP--IKPASG-----LKLKSY	348
	: * :***: :*: : : . :** * . :*	
	LLG	
JRE	TGTAEMVAPVLGRGCFEVPVNYGAACKFDVLQAVTAAVKDNPCLLGRDWLCQHILDWNFA	491
Mizuhopecten	TG--EMVPVLGR--FEVPVNYG--KFDGVLQAEVVKGDNPCLLGRDWLQHIQLDWNFI	412
JULE	SG-----QSIIVRGCIIVPVQYE--TQKSILPLIIVQGNRPSLIGRNWLKKLQNLWKQI	405
Oreochromis	SG-----QHIAVRCIMLPVQYG--TQNITLPLIVVQCDRPAIIGRNWLKKLQNLWKQI	400
	:* : * : :***: :*.***:** : *:*:	
JRE	GS--AISAGHDDIIDE--SKHPSVFEPGLGKVRGTKAKIYVDPQEKPLYFKARPT--A	543
Mizuhopecten	FS--ISHSDNSIIDEIVSKHPSVFEPGLGKVRGTKAKIYVDPQEKPLYFKARPTPYA	468
JULE	FTVHKVLVQKDAKPGKVLIRHQAVFSDDQCGKGFKARIRIKPNTAPVFCARPVVPA	465
Oreochromis	FTVHKVLVQKEAKPGVLEVIQRHQAVFSDDQCGKGFKARIHTKPNTPIFCARPVVPA	460
	: . : : :* :*. . * :* **:* .*: *:: ****. *	
	Domain I Domain II	
JRE	LR--EHEDTGCCAAAIISP-----FSAIVTGTTSBK--RIG--KVTVSKL-----	582
Mizuhopecten	LRDKIEHELDRLVAEGTISPVEFSEWATPIVPIVSKDSIRICGDYKVTNVKSKLDNYP	528
JULE	LKEAVEKELDRLEKMKVISKVEKSEWASPIVTPKTDKTIKICGDYKVSINQCIIEKHYP	525
Oreochromis	LKEAVEKELDRLEKVKVISKVEKSEWASPIVTPKADKTIKICGDYKVSINQCVVEERYP	520
	*: **:** .** :.**, .:** ** **:..:	
	Domain III Domain IV	
JRE	IPK-----VLATGSKLS-----AQELDDSK--TTITHKGYRLY-----VASP	617
Mizuhopecten	IPKTEVLYATLGGGTDYSKLDLSQAYQQLELDDSLKPYTTINTHKLGFVYNRLPYGVASA	588
JULE	LPNAEDLFATLEGGTSFSKLDLSHAYQQLELDEESEKYLVINTHKGLYKYSRLSYGVSSA	585
Oreochromis	LPNTEDLFATLAGGTSFSKLDLSHAYQQQLLELDEESEKYLVINTHKGLYKYNRLSYGVSSA	580
	:*: . * *: . * :**:. . **** * *:*	
	Domain V Domain VI	
JRE	G--FQR--TLLQGP--QVVDLVTG--RRQ--LNEVLNRLDKAGVKLKKDKCEF	661
Mizuhopecten	PGIFQRTMENLLQGIPQVIVRVDDILVTGKNRRQHLENLEAVLNRLDKAGVKLKRKCYF	648
JULE	PAIFQSVMDQILQGMHDVTCFLDDILITASSEKXHLQRLEEVLTREKHGLRVKLAKCRF	645
Oreochromis	PALFQSVMDHMLHGLEDLTCFLDDILITASSEKHLKRLEEVLTREKHGVRVKLSKCHF	640
	** :*: : * *:*. . : *: **:**: * :*: *	
	Domain VII	
JRE	MEKEVIFLGHKVDATGIHPVPEKVQAVQNAPRPTSVTELKAYLGLLNFNRLPNLSTLL	721
Mizuhopecten	LRKEVEYLGHRIINSEGMQPIEGKVMIAKDAPAPTNVKELQALLGMLNYYSCYLPRLSTLL	708
JULE	LQSSVEYLGHRIDKDLHPMEEKVAAITKAPEPTNVTELKSFGLLNYYSRFLNPNSTIL	705
Oreochromis	LQSSVEYLGHRIDGDLHPLEEKVAAIANAPEPTNVTELKSFGLLNYYSRFLNPNSTIL	700
	:...* :***: : :*: ** *: .** **.***:: **:**: .*: .** *	
	DAS	
JRE	APLHQLLKKEVPWCWKEEQEEVFKKSKELLQSNWVLIHYDERKELVLSCDASAYGVGAVL	781
Mizuhopecten	APLYALLGKDVEWKWDKAEDAFREAKDMLQSDTLVHYDPDKELVLSCDASPYGLGAVL	768
JULE	QPLHNLLRKDETIWTTACTQAFEDAKRLLQNKVLVHYSTRPLKLACDASPYGVGAVI	765
Oreochromis	QPLHNLLRKDAKIWTMECAKAFKDAKTLQNKVLVHYSTNPLKLACDASPYGVGAVI	760

(待续 to be continued)

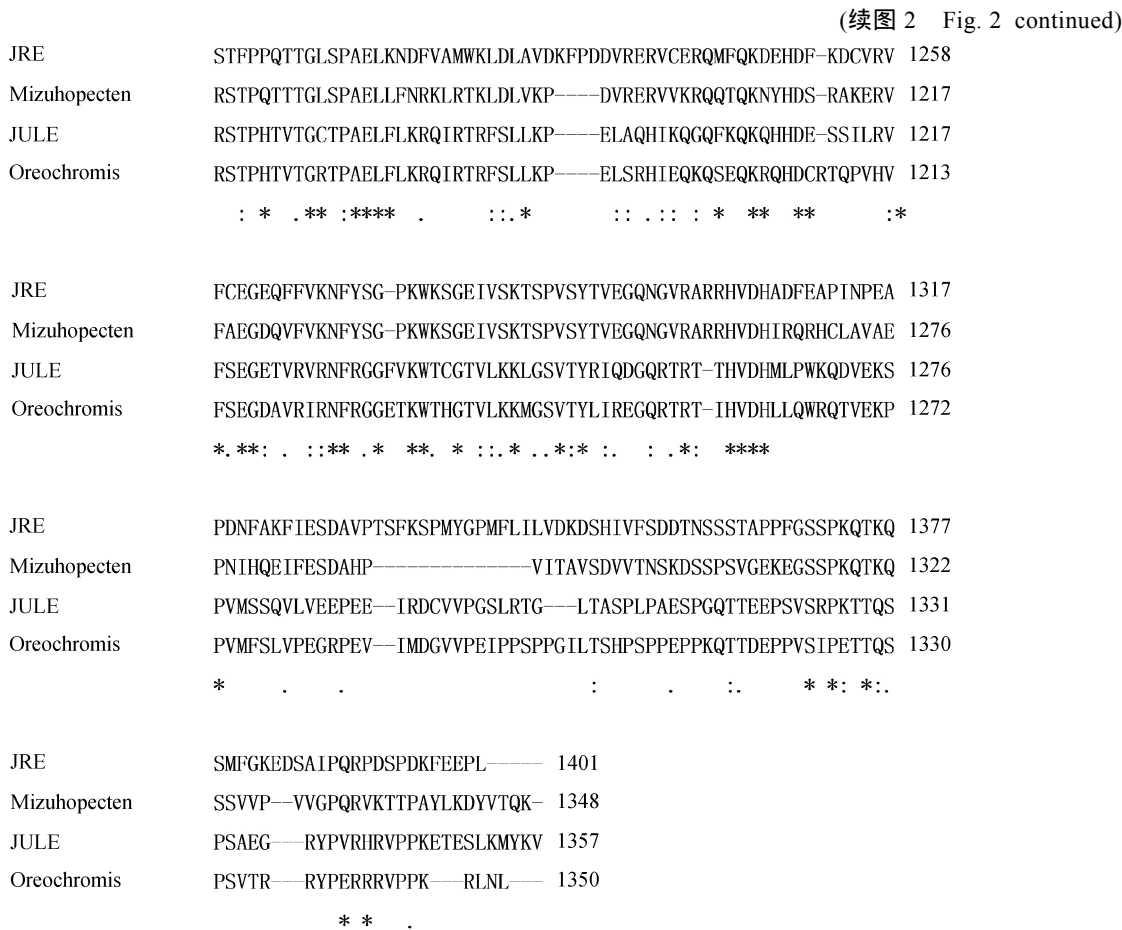


图 2 不同来源 *ty3-gypsy* 类型反转录转座子氨基酸序列的多重比较
保守结构域和区域以上标线表示; 相同的氨基酸序列以*表示.

Fig. 2 Alignment of protein sequences of JRE and JULE elements
Conserved motifs and domains are overlined; identical residues are marked by *.

进行多序列比对, 并利用 Clustal X 软件将序列匹配排列后, 再用 MEGA 4.0 软件采用近邻归群法 (Neighbor Joining, N-J)构建系统发育树(图 3)。从系统发育树可以看出, 建鲤 *JRE* 转座子和虾夷扇

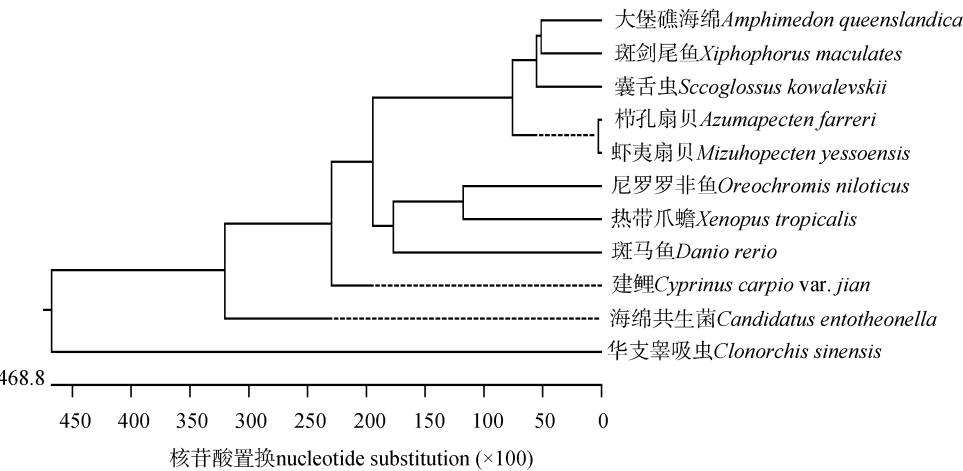


图 3 *ty3-gypsy* 分子系统树的构建

Fig. 3 Phylogenetic tree of *ty3-gypsy* retransposons from various species

贝、栉孔扇贝、大堡礁海绵和斑剑尾鱼等聚为一枝。

2.3 *JRE* 转座子拷贝数分析

采用定量 PCR 对 *JRE* 转座子在不同组织中的拷贝数进行了检测, 选择了 RT 区域一段特异的区域作为定量检测的目的片段。首先建立了 RT 基因的标准曲线方程($Y=-2.54X+26.78$, $R=0.998$), 对照 β -actin 标准曲线方程($Y=-3.45X+30.08$, $R=0.9991$)。将建鲤基因组和携带 *JRE* 转座子的阳性质粒进行倍比稀释。在不同的稀释倍数下, 经实时定量 PCR 检测, 结果表明建鲤基因组 DNA 中 *JRE* 转座子的拷贝数约为 124, 鲤鱼基因组 DNA 大小约为 1700 Mb^[34], 根据 *JRE* 转座子的大小为 5.2 kb, 预计 *JRE* 转座子在建鲤基因组中的比例约为 0.04%。

2.4 *JRE* 转座子在不同组织中的表达量

取建鲤脑、肾、脾、肝、肾和心脏等组织提取 RNA 进行定量表达研究, 结果见图 4。实验结果表明, *JRE* 转座子在脑、肾、脾、肝、肾和心脏中都有表达, 肝、心脏里表达量略高(图 4)。

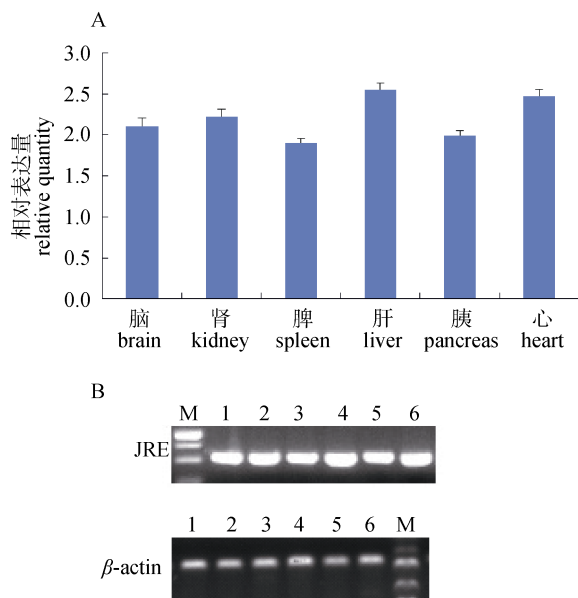


图 4 采用定量 PCR 检测鲤鱼各组织中 *JRE* 转座子 mRNA 表达量

Fig. 4 Differential mRNA expression of *JRE* elements in different tissues revealed by realtime RT-PCR

2.5 染色体原位杂交

采用针对 *JRE* RT 酶部位的 DNA 序列制备的

杂交探针进行原位杂交实验, 建鲤中期染色体见图 5B, 由于建鲤是二倍化了的四倍体, 染色体数为 $2n=100$, 原位杂交使用红色荧光染料对 DIG 标记进行显色和信号放大, 可以获得明亮的杂交信号, 探针被定位在染色体上, 由图 5A 可见多处散在的信号分布。

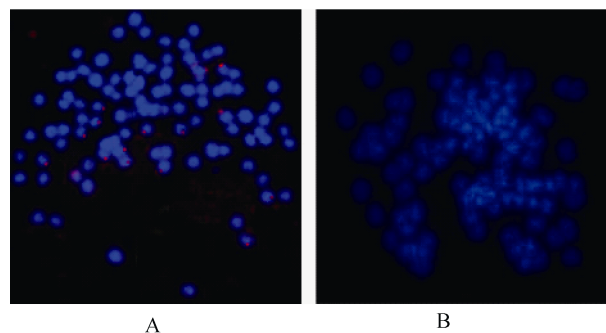


图 5 *JRE* 转座子定位结果

A 图为原位杂交阳性染色结果, B 图为阴性对照染色结果。

Fig. 5 Location of *JRE* in chromosome
A: chromosomal localization of the positive probe; B: FISH as a negative control.

3 讨论

本研究从 *BAC* 序列测定中发现了 *JRE* 转座子序列, 分析发现它具有典型的 *LTR* 反转录转座子的特点, 如包含 gag 蛋白和 pol 蛋白的完整阅读框^[35-36]。同源性分析进一步表明, *JRE* 与 *JULE*^[12]、*CFG1* 等转座子具有较高的相似性, 可能从进化上来说具有共同的祖先。研究表明, 鱼类中已报道的 Ty3-Gypsy 家族及相关返座元有 sushi 成分^[37]、*JULE* 成分、SW1 成分等。Butler 等^[29]在河鲀基因组中发现了一个全长 5645 bp 的 *sushi* 反转录转座子, 它的 ORF 序列类似于反转录病毒的 gag 基因序列, 同源性分析表明其类似于 *gypsy* 反转录转座子。Volf 等^[38]在斑剑尾鱼中发现 *JULE* 反转录转座子, 其全长为 4.8 kb, 侧翼有 202 bp 的长末端重复序列, 编码 gag 和 pol (包括蛋白酶、逆转录酶、RNase H 和整合酶), 不编码膜蛋白, 在基因组中有 3~4 个拷贝。此外在青鳉、罗非鱼、斑马鱼、河鲀等鱼类中均有相似成分存在, 是一个广布的反转录转座元。本研究中发现的 *JRE* 转座子与 *JULE* 转座子的相似性很高, 具有相类似

的分子结构, 据此可知 *JRE* 属于 *c* 家族的一员, 这也是我们首次在建鲤中发现的全长 *LTR* 类型转座子, 之所以说它是全长 *LTR* 转座子是因为它具有两侧完整的 *LTR* 区, 并且以 TG 与 CA 为标志。*LTR* 序列以 TGT 开始、ACA 结束是 *LTR* 反转录转座子的一个共有的特征^[8], 其 ORF 内部也包含 *ty3-gypsy* 的经典氨基酸结构域编码序列, 如 CCHC 结构域, 该结构域具有类似反转录病毒颗粒内结合到 RNA 上的功能。同时在 *JRE* 转座子 *LTR* 序列 203 位置中发现了 poly A AATAAAA 信号。同样在 *JRE* 转座子中存在可能的引物结合点 PBS (primer binding sites), 尽管 Volf 等^[30]的研究表明还没有相应的 tRNA 发现, 但是该序列却与 Ser-tRNA 3'端一段序列有互补性。这表明 *JRE* 转座子可能具有一定的活性。

研究表明, *ty3-gypsy* 转座子在植物基因组内的变化是很大的, 例如, 豌豆中 *ty3-gypsy* 占到基因组的 18%~35%^[39]。而本研究发现建鲤基因组中 *JRE* 拷贝数为 124, 占基因组大小的比例为 0.04%, 只是很少的一部分, 可能是由于 *JRE* 转座子在建鲤体内活跃程度不够; 同时 mRNA 检测结果显示, 该转座子在各组织中均有表达, 肝、心脏中相对表达量稍高, 表明这一转座子可作为转基因研究的载体来利用, 但是总的来说其表达程度不够活跃, 这也可能与水生动物细胞分裂速度快有关^[40]。对反转录转座子在染色体上的分布研究发现, *JRE* 转座子在建鲤的染色体上呈弥散分布, 基本上都分布于染色体的端部, Takahashi 等^[41]的研究表明转座子在染色体上的分布位置和数量没有规律性, 这表明 *ty3-gypsy* 型反转录转座子具有高度的异质性, 在不同物种内存在高度的多态性, 同时该结果再次验证了 *JRE* 在建鲤体内并不是一个拷贝数高的转座子。同时转座子数量对建鲤基因组大小的变化起到一定的作用。SanMiguel 等^[42]对玉米的研究表明反转录转座子填满了整个玉米基因组, 而且这些具有长末端的反转录转座子的 DNA 结构具有典型的反转录转座子完整结构, 只是在排列方式上有一定的相嵌。也就是说, 一个反转录转座子内部含有另一个完整的反转录转座子的序

列。通过对比现有的反转录转座子的研究资料可知, 转座子拷贝数的差异可能是造成高等动植物基因组大小差别很大的原因。尽管反转录转座子在整个基因组内的拷贝数可能很多, 但是由于反转录转座子具有很多亚群, 有些亚群在动植物基因组内的数量仅有一个或几个拷贝组成, 这些反转录转座子具有一定的结构特点, 容易区分, 从而可以彻底研究反转录转座子的转座规律, 最终利用其进行基因功能的研究。另外, 拷贝数也反映了反转录转座子在动植物基因组中的活跃程度。一个 *LTR* 反转录转座子在动物基因组内的拷贝数可从很少的几个拷贝到几千个拷贝, 不同谱系的反转录转座子具有不同的进化轨迹, 从而影响了基因组的大小和基因组重排, 最终导致基因组大小发生了变化^[2, 43]。多倍体, 特别是异源多倍体可能会改变亲代基因组中反转录转座子种群动态, 因此可能导致基因组规模缩小(通常也影响反转录转座元件的种群数)或增加^[44]。

综上所述, 本研究在前期实验中发现了一个完整结构的逆转录转座子, 对其全长的分析表明, 其具有典型的 *LTR* 逆转录转座子的典型结构; 其同源性分析表明, 其与 *JULE* 转座子具有较高的相似性, 但其在建鲤体内的拷贝数并不高, 表明其转录活性可能并不高, 对我们了解建鲤基因组构成和特点增加了知识储备, 同时为利用转座子的活性进行转基因研究提供了一种新的途径和工具。

参考文献:

- [1] Piednoël M, Donnart T, Esnault C, et al. LTR- retrotransposons in *R. exoculata* and other crustaceans: the outstanding success of GalEa-like copia elements[J]. PloS ONE, 2013, 8(3): e57675.
- [2] Henke C, Strissel P L, Schubert M T, et al. Selective expression of sense and antisense transcripts of the sushi-ichi-related retrotransposon – derived family during mouse placentalogenesis[J]. Retrovirology, 2015, 12: 9.
- [3] Cao Y F, Jiang Y R, Ding M Q, et al. Molecular characterization of a transcriptionally active Ty1/copia-like retrotransposon in *Gossypium*[J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(6): 1037–1047.
- [4] Raphael K A, Shearman D C A, Streamer K, et al. Germ-line

- transformation of the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni*, using a *piggyBac* vector in the presence of endogenous *piggyBac* elements[J]. *Genetica*, 2011, 139(1): 91–97.
- [5] Wang F, Wang R Y, Wang Y C, et al. Remobilizing deleted *piggyBac* vector post-integration for transgene stability in silkworm[J]. *Mol Genet Genomics*, 2015, 290(3): 1181–1189.
- [6] Jordan B J, Vogel S, Stark M R, et al. Expression of green fluorescent protein in the chicken using in vivo transfection of the *piggyBac* transposon[J]. *J Biotechnol*, 2014, 173: 86–89.
- [7] Golling G, Amsterdam A, Sun Z X, et al. Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development[J]. *Nature Genet*, 2002, 31: 135–140.
- [8] Lee S H, Kim J H, Park K C, et al. LTR-retrotransposons and inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) analysis in *Lilium* species[J]. *Genetica*, 2015, 143(3): 343–352.
- [9] Steinbauerová V, Neumann P, Novák P, et al. A widespread occurrence of extra open reading frames in plant Ty3/gypsy retrotransposons[J]. *Genetica*, 2011, 139(11): 1543–1555.
- [10] Abe H, Ohbayashi F, Shimada T, et al. Molecular structure of a novel *gypsy*-Ty3-like retrotransposon (*Kabuki*) and nested retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm *Bombyx mori*[J]. *Mol Gen Genet*, 2000, 263(6): 916–924.
- [11] Britten R J, McCormack T J, Mears T L, et al. Gypsy/Ty3-class retrotransposons integrated in the DNA of herring, tunicate, and echinoderms[J]. *J Mol Evol*, 1995, 40(1): 13–24.
- [12] Wang S, Bao Z M, Hu X L, et al. Two novel elements (*CFG1* and *PYG1*) of *Mag* lineage of Ty3/Gypsy retrotransposons from Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) and Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*)[J]. *Genetica*, 2008, 133(1): 37–46.
- [13] Miskey C, Izsvák Z, Plasterk R H, et al. The Frog Prince: a reconstructed transposon from *Rana pipiens* with high transpositional activity in vertebrate cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(23): 6873–6881.
- [14] Kawakami K. *Tol2*: a versatile gene transfer vector in vertebrates[J]. *Genome Biol*, 2007, 8(Suppl 1): S7.
- [15] Urasaki A, Mito T, Noji S, et al. Transposition of the vertebrate *Tol2* transposable element in *Drosophila melanogaster*[J]. *Gene*, 2008, 425(1–2): 64–68.
- [16] Kawakami K, Shima A, Kawakami N. Identification of a functional transposase of the *Tol2* element, an *Ac*-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(21): 11403–11408.
- [17] Kawakami K, Imanaka K, Itoh M, et al. Excision of the *Tol2* transposable element of the medaka fish *Oryzias latipes* in *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*[J]. *Gene*, 2004, 338(1): 93–98.
- [18] Sato Y, Kasai T, Nakagawa S, et al. Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos[J]. *Dev Biol*, 2007, 305(2): 616–624.
- [19] Hamlet M R J, Yergeau D A, Kuliyeve E, et al. *Tol2* transposon-mediated transgenesis in *Xenopus tropicalis*[J]. *Genesis*, 2006, 44(9): 438–445.
- [20] Balciunas D, Wangenstein K J, Wilber A, et al. Harnessing a high cargo-capacity transposon for genetic applications in vertebrates[J]. *PLoS Genet*, 2006, 2(11): e169.
- [21] Zhang J S, Sun X Y. Study on selective breeding in new strain of *Cyprinus carpio* var. *Jian*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(3): 287–292. [张建森, 孙小异. 建鲤新品系的选育[J]. *水产学报*, 2007, 31(3): 287–292.]
- [22] Zhu J, Wang J X, Gong Y S. Genetic improvement of Jian carp, *Cyprinus carpio* var. *jian*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(2): 7–9. [朱健, 王建新, 龚永生. 建鲤遗传改良的初步研究[J]. *中国水产科学*, 2001, 8(2): 7–9]
- [23] Cao L P, Ding W D, Jia Y Y, et al. Analysis of chromosome karyotypes of *Oreochromis aurea*(♀), *Siniperca chuatsi*(♂) and their offspring[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2006, 14(2): 187–192. [曹丽萍, 丁炜东, 贾永义, 等. 奥利亚罗非鱼(♀)×鳊(♂)杂交后代及其双亲的染色体核型分析[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(2): 187–190.]
- [24] Coates B S, Fraser L M, French B W, et al. Proliferation and copy number variation of BEL-like long terminal repeat retrotransposons within the *Diabrotica virgifera virgifera* genome[J]. *Gene*, 2014, 534(2): 362–370.
- [25] Yin H, Liu J, Xu Y X, et al. *TARE1*, a mutated *Copia*-like LTR retrotransposon followed by recent massive amplification in Tomato[J]. *PloS ONE*, 2013, 8(7): e68587.
- [26] Purugganan M D, Wessler S R. Molecular evolution of magellan, a maize Ty3/gypsy-like retrotransposon[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(24): 11674–11678.
- [27] Springer M S, Davidson E H, Britten R J. Retroviral-like element in a marine invertebrate[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(19): 8401–8404.
- [28] Iwasaki S, Suzuki S, Pelekanos M, et al. Identification of a novel *PNMA-MSI* gene in marsupials suggests the LTR retrotransposon-derived *PNMA* genes evolved differently in marsupials and eutherians[J]. *DNA Res*, 2013, 20(5): 425–436.

- [29] Butler M, Goodwin T, Simpson M, et al. Vertebrate LTR retrotransposons of the Tf1/sushi group[J]. *J Mol Evol*, 2001, 52(3): 260–274.
- [30] Volff J N, Brosius J. Modern genomes with retro-look: retrotransposed elements, retroposition and the origin of new genes[J]. *Genome Dyn*, 2007, 3: 175–190.
- [31] Norelli S, El Daker S, D'Ostilio D, et al. Response of feline immunodeficiency virus (FIV) to tipranavir may provide new clues for development of broad-based inhibitors of retroviral proteases acting on drug-resistant HIV-1[J]. *Curr HIV Res*, 2008, 6(4): 306–317.
- [32] Capy P, Vitalis R, Langin T, et al. Relationships between transposable elements based upon the integrase-transposase domains: is there a common ancestor?[J]. *J Mol Evol*, 1996, 42(3): 359–368.
- [33] Ke N, Voytas D F. cDNA of the yeast retrotransposon Ty5 preferentially recombines with substrates in silent chromatin[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(1): 484–494.
- [34] Wang Q L, Ji P F, Xu P, et al. Identification and characterization of a novel Tc1 transposon in the *Cyprinus carpio* genome[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(6): 1392–1398. [王全乐, 冀培丰, 徐鹏, 等. 鲤基因组中 1 个新 Tc1 类转座子的发现与鉴定[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(6): 1392–1398.]
- [35] Brandt J, Veith A M, Volff J N. A family of neofunctionalized Ty3/gypsy retrotransposon genes in mammalian genomes[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2005, 110(1–4): 307–317.
- [36] Belyayev A, Raskina O, Nevo E. Variability of the chromosomal distribution of Ty3-gypsy retrotransposons in the populations of two wild Triticeae species[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2005, 109(1–3): 43–49.
- [37] Poulter R, Butler M. A retrotransposon family from the pufferfish (fugu) *Fugu rubripes*[J]. *Gene*, 1998, 215(2): 241–249.
- [38] Volff J N, Körtting C, Scharl M. Ty3/Gypsy retrotransposon fossils in mammalian genomes: did they evolve into new cellular functions?[J]. *Mol Biol Evol*, 2001, 18(2): 266–270.
- [39] Chavanne F, Zhang D X, Liaud M F, et al. Structure and evolution of Cyclops: a novel giant retrotransposon of the Ty3/Gypsy family highly amplified in pea and other legume species[J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 37(2): 363–375.
- [40] Mashanov V S, Zueva O R, García-Arrarás J E. Retrotransposons in animal regeneration: Overlooked components of the regenerative machinery?[J]. *Mob Genet Elem*, 2012, 2(5): 244–246.
- [41] Takahashi A, Shiroishi T, Koide T. Genetic mapping of escalated aggression in wild-derived mouse strain MSM/Ms: association with serotonin-related genes[J]. *Front Neurosci*, 2014, 8: 156.
- [42] SanMiguel P, Tikhonov A, Jin Y K, et al. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome[J]. *Science*, 1996, 274(5288): 765–768.
- [43] Nakayashiki H, Matsuo H, Chuma I, et al. Pyret, a Ty3/Gypsy retrotransposon in *Magnaporthe grisea* contains an extra domain between the nucleocapsid and protease domains[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(20): 4106–4113.
- [44] Frahy M B, Sun C, Chong R A, et al. Low levels of LTR retrotransposon deletion by ectopic recombination in the gigantic genomes of salamanders[J]. *J Mol Evol*, 2015, 80(2): 120–129.

Isolation and analysis of a *ty3-gypsy* retrotransposon from the genome of *Cyprinus carpio* var. *jian*

DING Weidong, CAO Liping, CAO Zheming, BING Xuwen

Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: Transposable elements are major constituents of eukaryote genomes and have a significant effect on genome structure and stability. They also contribute to the genetic diversity and evolution of organisms. Knowledge of their distribution among several genomes is an essential condition to study their dynamics and to better understand their role in species evolution. Long terminal repeat (LTR)-retrotransposons have been reported in diverse eukaryote species, indicating a ubiquitous distribution. Among retrotransposons, the transposable element (TE) class, which are specific to eukaryotes, transpose via an RNA intermediate. Based on their structure, LTR-retrotransposons have been divided into two classes: *ty3-gypsy* and *ty1-copia*. In previous research, we found a *ty3-gypsy*-like retrotransposon, named JRE, in the genome of Jian carp, *Cyprinus carpio* var. *jian*. To investigate the function of JRE in the genome of Jian carp, PCR amplification, fluorescence quantitative PCR and fluorescent in situ hybridization were used to explore the structure and characteristics of JRE retrotransposon. Multiple alignments of DNA and protein sequences were constructed using MEGA 5.0 software and were manually curated using BioEdit. Pairwise distances were estimated using the option pairwise deletion of gaps in MEGA5.0. The full-length JRE retrotransposon is 5126 bp, which includes two LTRs of 470 bp at the 5' end and 453 bp at the 3' end, and two open reading frames (ORFs) between them. One ORF of 4203 bp encodes the group-specific antigen (*GAG*) and polyprotein (*POL*). The *pol* gene has a typical *Ty3/gypsy* retrotransposon structure, and the gene order is protease, reverse transcriptase, RNase H, and integrase (PR-RT-RH-IN). A phylogenetic analysis of the *pol* gene showed that it has similarities of 40.7%, 40%, 32.8%, and 30.1% to retrotransposons of the Yesso scallop, Farrer's scallop, a Great Barrier Reef sponge, and the spot swordtail fish, respectively. Therefore, JRE might belong to the JULE retrotransposon family. The copy number of the JRE retrotransposon in the genome of the Jian carp is 124, as determined by real-time quantitative PCR. The mRNA of the JRE retrotransposon is expressed in five Jian carp tissues: the liver, kidney, blood, muscle, and gonad, and is slightly higher in the kidney and liver than in the other tissues. Fluorescent in situ hybridization shown that JRE is randomly distributed in Jian carp chromosomes and no regular patterns were found. In conclusion, the complete structure of a retrotransposon found in a previous study was determined. Detailed analyses indicated that it has the typical structure of an LTR retrotransposon. Phylogenetic analysis showed that it is highly similar to JULE transposons. Its copy number in the Jian carp is not high, suggesting that its transcriptional activity is low. These findings extend our knowledge of the structure and features of the Jian carp genome, and might provide a new method of transgenic fish production.

Key words: *Cyprinus carpio* var. *jian*; retrotransposon; copy number; fluorescent *in situ* hybridization

Corresponding author: CAO Liping, E-mail: caolp@ffrc.cn; BING Xuwen, E-mail: bingxw@ffrc.cn