

jnk3 基因在金鱼和斑马鱼不同发育时期胚胎与成体不同组织中的分化表达

陈丽莉^{1,2#}, 邹立军^{1#}, 熊振¹, 刘姣¹,
廖高鹏¹, 刘文彬¹, 刘少军¹, 肖亚梅^{1*}, 李万程^{1,3*}

(1. 湖南师范大学生命科学学院,教育部蛋白质化学和鱼类发育生物学重点实验室,湖南长沙 410081;

2. 中南林业科技大学,生物技术开放性中心实验室,湖南长沙 410004;

3. Departments of Biochemistry and Molecular Biology, Ophthalmology and Visual Sciences,
University of Nebraska Medical Center, Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-5870)

摘要: JNKs 是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族重要成员,参与应激反应和动物体轴的构建。为了进一步了解 JNK 家族在动物发育中的功能,首次分离和克隆了金鱼 *jnk3* 基因,研究了 *jnk3* 在金鱼和斑马鱼组织特异性和胚胎发育特异性表达状况。金鱼 *jnk3* 基因 cDNA 总长 1 794 bp,其中阅读框 1 293 bp,编码 430 个氨基酸。对 *jnk3* 基因序列及其推导的氨基酸序列进行同源性分析,结果显示,*jnk3* 基因在脊椎动物较为保守,金鱼 *jnk3* 基因核苷酸序列与斑马鱼、人的同源性分别为 94.1% 和 80.7%,金鱼 *jnk3* 基因氨基酸序列与斑马鱼、人的同源性分别为 99.7% 和 93.4%。*jnk3* 基因在鱼类成体中的表达存在着显著的组织差异,在金鱼和斑马鱼脑和精巢组织的表达具专一性,此外在斑马鱼心脏中也检测到 *jnk3* 的表达。RT-PCR 检测结果显示,在鱼类胚胎发育中,神经胚期开始检测到 *jnk3* 基因 mRNA 表达,从神经胚到心跳期胚胎,*jnk3* 基因表达水平逐渐增高,此后直至出膜一直保持较高的表达水平。研究表明,*jnk3* 基因可能在鱼类后期的胚胎发育和成体脑、精巢与心脏发育中具有重要作用。

关键词: 金鱼; 斑马鱼; JNK3; 胚胎发育

中图分类号: Q 786; S 917

文献标识码: A

JNK(c-Jun N-terminal kinases)是对高温、渗透压变化、紫外线、DNA 损伤剂、蛋白质抑制剂、炎症细胞因子反应强烈的一类丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)家族重要成员, JNK 与上游激活分子和下游效应分子组成一个准确高效的信号转导体系,在细胞分裂、分化、凋亡、癌变及免疫反应中起着重要的调控作用^[1-3]。在脊椎动物中已检测到 *jnk1* *jnk2* *jnk3* 基因^[4],它们分别编码 46 ku JNK1^[5], 54 ku JNK2^[5-6] 和 48 ku JNK3^[7]。JNK1 和 JNK2 广泛表达于各组织中, JNK1 和 JNK2 在哺乳动物个体

发育特别是神经系统的形成和分化中具有重要作用, *jnk1* 和 *jnk2* 基因敲除小鼠会导致胚胎致死^[8-9]。JNK3 在哺乳动物中仅限表达于脑、心脏等组织^[3,8-9],研究证实 *jnk3* 基因是小鼠神经发育相关基因^[10-11]。本研究室以金鱼为实验材料研究了蛋白磷酸酶和蛋白磷酸酶 ZA 在脊椎动物体内的分化表达模式^[12-13]。本研究选用金鱼(*Carassius auratus auratus*)和斑马鱼(*Danio rerio*)为研究材料,探讨 *jnk3* 基因在鱼类胚胎发育和成体不同组织中的分化表达模式,以进一步掌握 JNKs 家族在动物个体发育中的功能。

收稿日期:2010-08-17 修回日期:2010-12-20

资助项目:国家自然科学基金项目(30871908);湖南省自然科学基金(09JJ3039);湖南师大优秀青年人才计划项目(070625);湖南省自然科学版创新研究群体(10JJ7004);国家公益性行业科研专项资金(2009-03046)

*作者简介:陈丽莉,邹立军为同等贡献作者

通讯作者:肖亚梅, E-mail: yameix@126.com; 李万程, E-mail: dwli1688@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用“红帽子”金鱼购自长沙市花鸟市场(太平街商贸城花鸟鱼市场),暂养于鱼池内。在繁殖季节,选取已达性成熟的雌雄性金鱼,通过人工挤卵和人工授精获得金鱼受精卵,将受精卵置于培养皿中静水孵化获取不同发育时期的金鱼胚胎。实验中所用斑马鱼购自武汉中国科学院水生生物研究所。养殖于循环水养殖系统,通过人工调节光周期对斑马鱼进行催产,采集斑马鱼受精卵,置于培养皿中静水孵化,获取不同发育时期的胚胎。

选取已达性成熟的金鱼(雌雄各3尾,平均体长约为12 cm)与斑马鱼(雌雄各6尾,平均体长约为3.5 cm)剪鳃放血后,分别取其肝脏、精巢、卵巢、脑、肾脏、肌肉、心脏、鳃和鳍等9种组织。

上述所取不同时期胚胎及成体组织样品置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暂存。

1.2 实验方法

金鱼 *jnk3* 基因 cDNA 全长克隆 保守片段的分离:从金鱼精巢组织中提取总 RNA, cDNA 反转录试剂盒(RevertAid First strand cDNA Synthesis Kit; Fermentas 公司)进行 Reverse Transcription 反应。根据已报道的斑马鱼 *jnk3* 基因(GenBank accession number: nm001037701)保守序列设计一对简并引物 J1 和 J2 (J1: 5'-GCCTTTTGTTCAGGGTTTTG-3', J2: 5'-ATAGTT-ACGCACCGTTGGC-3')。以 cDNA 为模板,引物 J1 和 J2 进行 PCR, PCR 反应总体积 20 μL (PCR Taqmix 2 \times 溶液 10 μL , 灭菌 H_2O 7 μL , 逆转录产物 cDNA 模板和正负引物各 1 μL)。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 切下目的条带, 试剂盒回收纯化、克隆后测序。

3'RACE 方法: 特异引物 J3 和 J4 (J3: 5'-CAGCCAACGGTGCCTAACT-3', J4: 5'-CGGAGGTCATCCTGGGCAT-3') 是根据已获得的金鱼 *jnk3* 基因保守片段设计。使用 Powerscript Reverse Transcriptase 试剂盒(购自 Clontech 公司)获取 3'cDNA, 取 1 μL 作为模板, 用 J3 和 10 \times UPM 混合引物(long 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 5'-CTAAT-ACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATC-

AACGCAGAGT-3'; short 2 $\mu\text{mol/L}$ 5'-CTAATA-CGACTCACTATAGGGC-3') 进行 PCR 反应, PCR 总体积 20 μL (PCR Taqmix 2 \times 溶液 10 μL , 灭菌 H_2O 7 μL , 逆转录产物 cDNA 模板和正负引物各 1 μL), 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 63 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。为提高扩增效率及扩增的特异性, 将上述 PCR 产物稀释 40 倍, 取 1 μL 作模板, 用引物 J4 和 NUP (10 $\mu\text{mol/L}$ 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') 进行 PCR 反应, PCR 总体积 20 μL , 反应体系同上, PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测后切下目的带, 试剂盒回收、克隆后测序。

5'RACE 方法: 根据已获得的金鱼 *jnk3* 基因保守片段设计用于 5'RACE 的特异引物 J5 和 J6 (J5: 5'-GCTCCCTGTATGCTCTCTTGGC-3', J6: 5'-TGTCACCTTTGCTTTTGCTC-3')。使用 Powerscript Reverse Transcriptase 试剂盒(购自 Clontech 公司)获取 5'cDNA, 取 1 μL 作为模板, 用 J5 和 10 \times UPM 混合引物进行 PCR 反应。第一次 PCR 反应条件 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 63 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。第二次 PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 反应体系及流程同 3'RACE。

RT-PCR 检测 *jnk3* 基因的表达 分别选取已达性成熟的金鱼、斑马鱼, 进行人工催产获取不同发育时期的胚胎材料: 两细胞期、多细胞期、囊胚期、原肠期、神经胚、视原基、脑泡期、肌肉效应期、心跳期、眼色素期、体色素期和出膜期。选取健壮的金鱼、斑马鱼, 剪鳃放血数分钟后迅速摘取 7 种不同的组织: 肝脏、精巢、卵巢、脑、肾脏、肌肉、心脏、鳃和鳍。利用 PROMEGA 试剂盒提取上述胚胎或组织总 RNA。根据金鱼、斑马鱼 *jnk3* 基因序列设计 RT-PCR 所用的引物 G-1、G-2、Z-1、Z-2 (表 1)。PCR 反应总体积 20 μL (PCR Taqmix 2 \times 溶液 10 μL , 灭菌 H_2O 7 μL , 逆转录产物 cDNA 模板和正负引物各 1 μL)。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;

94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。以 β -actin 作为实验内参。

2 结果

2.1 金鱼 *jnk3* 基因核苷酸序列及氨基酸序列

取金鱼性腺总 RNA 进行 RT-PCR。根据已报道的斑马鱼 *jnk3* 基因 (GenBank accession number nm001037701) 保守序列设计简并引物 J1 和 J2。用引物 J1 和 J2 扩增出 *jnk3* 部分基因片段并设计引物 J3 和 J4, 进行 3' RACE, 获得 800 bp 左右的 DNA 带, 克隆后经酶切鉴定、测序, 得到 764 bp 序列。根据已获得的 *jnk3* 序列设计 5' RACE 引物 J5、J6, 获得 400 bp 左右的 DNA 条带, 克隆后酶切鉴定、测序, 序列长度为 379 bp 序列。

将上述序列拼接得到金鱼 *jnk3* 基因全序列 (GenBank accession number: FJ183484) (图 1), 该 cDNA 全长 1 794 bp, 5' 非编码翻译区 249 bp; 3' 非编码翻译区 223 bp (不包括 poly(A)), 其中阅读框 1 293 bp, 编码 430 个氨基酸。

表 1 PCR 所用引物及其序列

Tab. 1 The primers of PCR

样本 sample	引物名称 primer names	引物序列 primer sequences
金鱼 golden fish	G-1	5'-TATTTGGTCAGTTGGTTGC-3'
	G-2	5'-CATTCCTTTGTCTCTCCTCG-3'
斑马鱼 zebra fish	Z-1	5'-GCCTTTTGTTCAGGGTTTTC-3'
	Z-2	5'-ATAGTTACGCACCGTTGGC-3'
实验内参 internal reference	β -actin (+)	5'-CCGTGACCTGACTGACTACCTC-3'
	β -actin (-)	5'-ATACCGCAAGATTCCATACCC-3'

```

1   ACG CGG GGA GGA TCG TAA TGG TAC AGG CAG CAT CCT GCA GCA CAA   45
46   TGG TGA GCG CGC AGT GAT TCA GCA TCG CAA ACT CAG CCT TTA ATC   90
91   CTT CTC TTT TTG TTT CAC CTA CAT TTT TTT TTC TTT ATA TCT GCT  135
136  TGA TTC GTC CTC ACA GAG GTC TTT AAA TAC GTC GCG TAC TGG GAT  180
181  GTT TTG AAC AGG ACA GAA CTG TCA CCG GAC CGG GAT CGT CGG ACG  225
226  GGC AGC TGG CAC GGA ATG GTA TTT ATG AAC AGA TGT TTC TTA TAT  270
      M V F M N R C F L Y   10
271  AAC TGC AGT GCT CCA GTC CTG GAT GTG AAG ATT GCC TTT TGT CAG  315
      N C S A P V L D V K I A F C Q   25
316  GGG TTT GGC AAA CAA GTT GAT GTT TCT TAC ATT GCC CAG CAT TAC  360
      G F G K Q V D V S Y I A Q H Y   40
361  AAC ATG AGC AAA AGC AAA GTG GAC AAC CAG TTC TAC AGC GTG GAA  405
      N M S K S K V D N Q F Y S V E   55
406  GTA GGA GAT TCC ACC TTC ACG GTT CTC AAA CGG TAC CAA AAT CTA  450
      V G D S T F T V L K R Y Q N L   70
451  AAG CCC ATT GGT TCT GGG GCT CAG GGA ATA GTG TGT GCT GGA TAT  495
      K P I G S G A Q G I V C A G Y   85
496  GAC GCC GTC CTG GAC AGA AAT GTG GCC ATT AAG AAA CTC AGC AGA  540
      D A V L D R N V A I K K L S R   100
541  CCT TTT CAG AAC CAG ACT CAT GCC AAG AGA GCA TAC AGG GAG CTG  585
      P F Q N Q T H A K R A Y R E L   115
586  GTG CTT ATG AAA TGT GTC AAT CAC AAA AAC ATC ATC AGC TTA TTA  630
      V L M K C V N H K N I I S L L   130
631  AAT GTC TTC ACA CCA CAG AAG TCT TTA GAG GAA TTC CAA GAT GTT  675
      N V F T P Q K S L E E F Q D V   145
676  TAC CTG GTC ATG GAG CTG ATG GAC GCA AAC CTT TGC CAG GTG ATT  720
      Y L V M E L M D A N L C Q V I   160
721  CAG ATG GAA CTT GAC CAT GAG AGG ATG TCT TAC CTG CTG TAC CAG  765
      Q M E L D H E R M S Y L L Y Q   175
766  ATG TTG TGT GGA ATC AAA CAC CTG CAC TCA GCC GGC ATC ATC CAC  810
      M L C G I K H L H S A G I I H   190
811  AGG GAT CTG AAA CCT AGC AAT ATT GTG GTG AAA TCC GAC TGT ACG  855
      R D L K P S N I V V K S D C T   205
856  CTG AAG ATC TTG GAC TTT GGG TTG GCG AGA ACT GCT GGC ACT AGC  900
      L K I L D F G L A R T A G T S   220
901  TTT ATG ATG ACA CCT TAC GTG GTG ACG CGG TAC TAC AGG GCC CCG  945
      F M M T P Y V V T R Y Y R A P   235

```

946	GAG GTC ATC CTG GGC ATG GGC TAC AAG GAG AAC GTG GAT ATT TGG	990
236	E V I L G M G Y K E N V D I W	250
991	TCA GTT GGT TGC ATC ATG GGA GAA ATG GTG CGC CAC AAA ATT CTA	1035
251	S V G C I M G E M V R H K I L	265
1036	TTC CCC GGC AGG GAT TAC ATT GAC CAG TGG AAT AAG GTT ATA GAG	1080
266	F P G R D Y I D Q W N K V I E	280
1081	CAG CTT GGC ACA CCC TCC CCT GAG TTC ATG AAG AAA TTG CAG CCA	1125
281	Q L G T P S P E F M K K L Q P	295
1126	ACG GTG CGT AAC TAT GTG GAG AAC AGG CCA AAA TAC GCC GGC CTG	1170
296	T V R N Y V E N R P K Y A G L	310
1171	ACC TTC CCC AAA CTC TTC CCT GAT TGC CTC TTC CCT GCA GAC TCG	1215
311	T F P K L F P D C L F P A D S	325
1216	GAG CAC AAC AAA CTC AAA GCG AGT CAG GCC AGA GAC CTG CTG TCT	1260
326	E H N K L K A S Q A R D L L S	340
1261	AAG ATG CTG ATC ATT GAT CCC GCT AAG CCG ATA TCA GTG GAC GAG	1305
341	K M L I I D P A K R I S V D E	355
1306	GCC CTG CAG CAC CCC TAC ATC AAC GTG TGG TAC GAC CCG GCC GAG	1350
356	A L Q H P Y I N V W Y D P A E	370
1351	GTG GAG GCA GCC AGG AAT CAG CAG ATA TCC ATG CCT CCT CCA CAG	1395
371	V E A A R N Q Q I S M P P P Q	385
1396	ATC TAT GAT AAA CAG CTA GAT GAG AGG GAA CAC TCG ATT GAT GAA	1440
386	I Y D K Q L D E R E H S I D E	400
1441	TGG AAA GAG CTC ATC TAT AAA GAG GTG ATG AAC TTC GAG GAG AGA	1485
401	W K E L I Y K E V M N F E E R	415
1486	ACA AAG AAT GGT GTT GTG AAG GGA CAG CCC TCT CCC TCA GCG CAG	1530
416	T K N G V V K G Q P S P S A Q	430
1531	GTG CAG CCA TGA ACA GCA GCG AGA GCC TCC CCC CCT CCC CCT CCG	1575
431	V Q P *	
1576	TCA ACG ACA TCT CCT CCA TGT CCA CCG ACC AGA CCC TGG CCT CCG	1620
1621	ATA CCG ACA GCA GCC TGG AGA CCT CCG CCG GAC CGC TGG GGT GCT	1665
1666	GCA GGT GAC TAA CCG CCT GTC TGC GCA ACC CCA TGT TCT TCA GAA	1710
1711	GGT GAT TGG CAC CCG AAA GAG AAA TCC ACA AAC CTC GAA AAC ATG	1755
1756	TAA TTA CGA GAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA	1794

图1 金鱼 *jnk3* 基因核苷酸及蛋白质序列Fig. 1 *jnk3* gene nucleotide and amino acid sequence of goldfish cDNA

2.2 金鱼 *jnk3* 基因序列分析

使用 BioEdit 7.0 对金鱼以及 Genbank 中已发表的斑马鱼、非洲爪蟾、小鼠、牛、人等 6 种脊椎动物的 *jnk3* 基因序列及其推导的氨基酸序列进行同源性分析(图 2, 图 3)。金鱼 *jnk3* 基因核苷酸序列与斑马鱼、非洲爪蟾、小鼠、牛、人的同源性分别为 94.1% , 77.9% , 80.6% , 67.7% , 80.7% ; 所推导的氨基酸序列的同源性分别为 99.7% , 92.2% , 93% , 78.3% , 93.4% 。

2.3 *jnk3* 在金鱼、斑马鱼成体不同组织 mRNA 表达水平检测结果

提取金鱼肝脏、肌肉、卵巢、精巢、大脑、肾脏、心脏、鳃及尾鳍 9 种不同组织 RNA, 先后进行了 3 次重复 RT-PCR 实验, 检测了 *jnk3* 基因在不同组

织中的表达, 并使用生物软件 GEL-PRO 对 3 次 PCR 产物的凝胶图进行了半定量灰度分析, PCR 扩增图谱显示, *jnk3* 基因可在金鱼脑和精巢组织中检测到, 其在脑组织中的表达量最高, 精巢组织次之, 其它 7 种组织中均未检测到 *jnk3* 基因表达(图 4)。

对斑马鱼成体的肝脏、肌肉、卵巢、精巢、大脑、肾脏、心脏、鳃及尾鳍 9 种不同组织 *jnk3* 基因 mRNA 检测结果显示, 脑和精巢组织中有 *jnk3* 基因的表达, 与金鱼不同的是, 在斑马鱼心脏中也检测到有 *jnk3* 基因的表达(图 5)。

2.4 *jnk3* 基因在金鱼、斑马鱼不同发育时期胚胎 mRNA 表达水平检测结果

检测了两细胞期、多细胞期、囊胚期、原肠期、

神经胚、视原基、脑泡期、肌肉效应期、心跳期、眼色素期、体色素期和出膜期共 12 个不同发育时期金鱼胚胎 *jnk3* 基因的表达(图 6)。金鱼受精卵、囊胚及原肠胚等早期发育胚胎中均未检测到 *jnk3*。自神经胚开始,随着胚胎发育,*jnk3* 基因表

达量逐渐增高。

jnk3 基因在斑马鱼胚胎发育过程中的表达与金鱼检测的结果相一致,在神经胚发育期之后,*jnk3* 基因的表达随着胚胎发育逐渐增强。

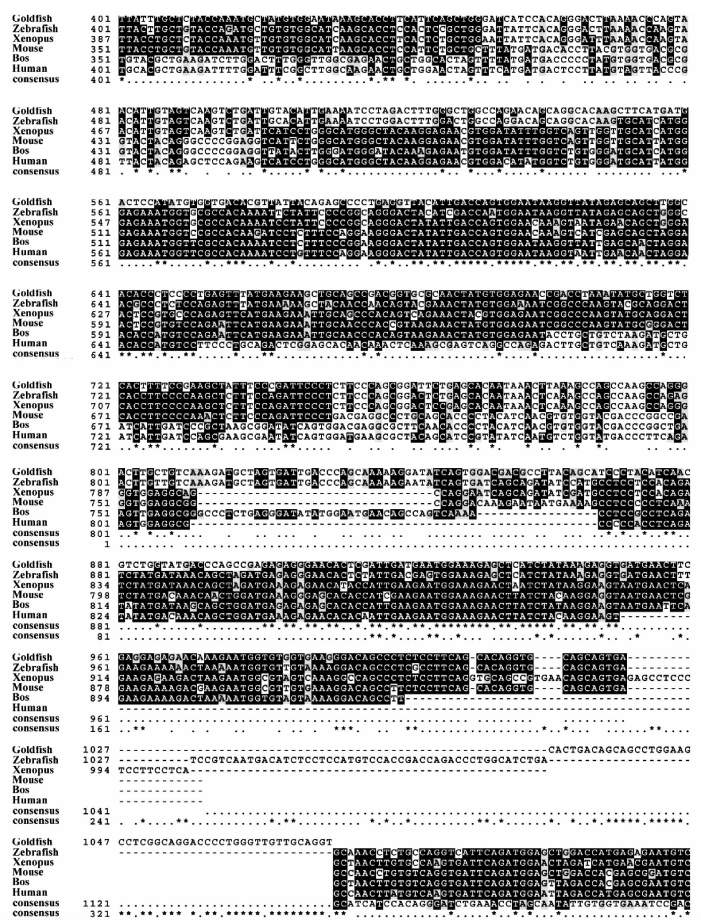


图 2 金鱼、斑马鱼、爪蟾、小鼠、牛和人 6 种脊椎动物 *jnk3* 基因核苷酸序列比对

Fig. 2 *jnk3* gene nucleotide sequence analysis for goldfish, zebrafish, xenopus, mouse, bos, and human

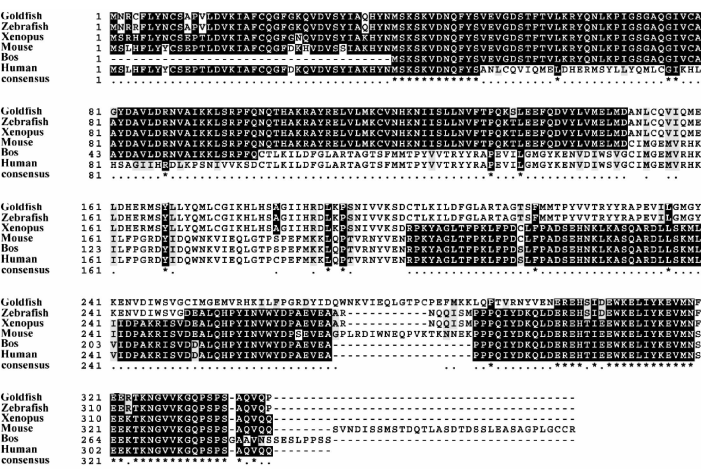


图 3 金鱼、斑马鱼、爪蟾、小鼠、牛和人 6 种脊椎动物 JNK3 氨基酸序列比对

Fig. 3 JNK3 amino acid sequence analysis for goldfish, zebrafish, xenopus, mouse, bos, and human

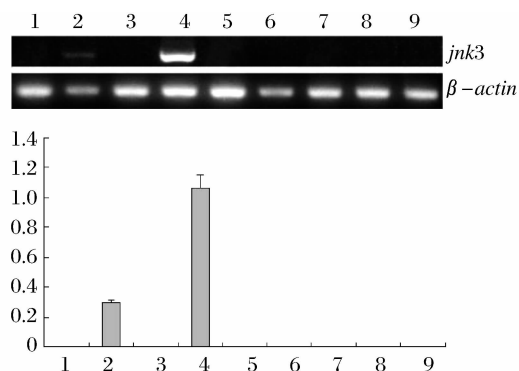


图4 *jnk3* 基因在金鱼 9 种不同组织中 mRNA 水平的表达

1. 肝; 2. 精巢; 3. 卵巢; 4. 脑; 5. 肾; 6. 肌肉; 7. 心; 8. 鳃; 9. 鳍。

Fig. 4 The mRNA expression of *jnk3* in goldfish different tissues

1. liver; 2. testis; 3. ovary; 4. brain; 5. kidney; 6. muscle; 7. heart; 8. branchia; 9. fin.

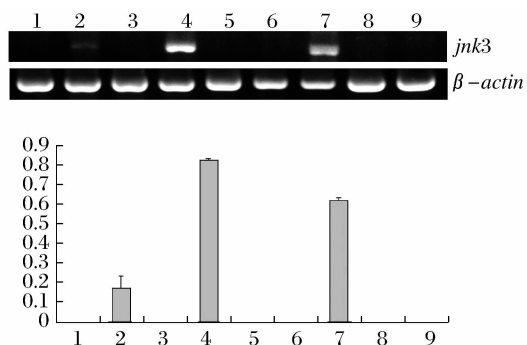


图5 *jnk3* 在斑马鱼 9 种不同组织中 mRNA 水平的表达

1. 肝; 2. 精巢; 3. 卵巢; 4. 脑; 5. 肾; 6. 肌肉; 7. 心; 8. 鳃; 9. 鳍。

Fig. 5 The mRNA expression of *jnk3* in zebrafish different tissues

1. liver; 2. testis; 3. ovary; 4. brain; 5. kidney; 6. muscle; 7. heart; 8. branchia; 9. fin.

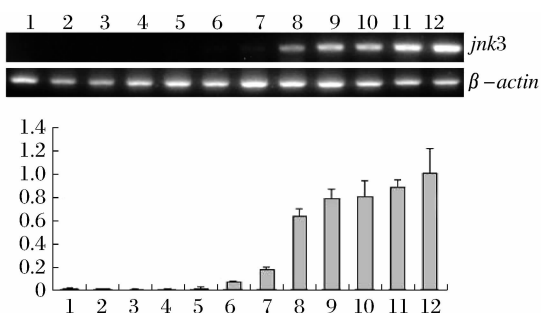


图6 *jnk3* 基因在金鱼不同发育时期胚胎 mRNA 水平的表达

1. 两细胞期; 2. 多细胞期; 3. 囊胚期; 4. 原肠胚期; 5. 神经胚; 6. 视原基; 7. 脑泡期; 8. 肌肉效应期; 9. 心跳期; 10. 眼色素期; 11. 体色素期; 12. 出膜期。

Fig. 6 The mRNA expression of *jnk3* in goldfish embryo

1. two cells stage; 2. multi-cells stage; 3. blastula; 4. gastrula; 5. neurula; 6. optic primordium; 7. brain vesicle; 8. muscle movement; 9. heart-beat; 10. eye pigmentation; 11. body pigmentation; 12. hatching larvae.

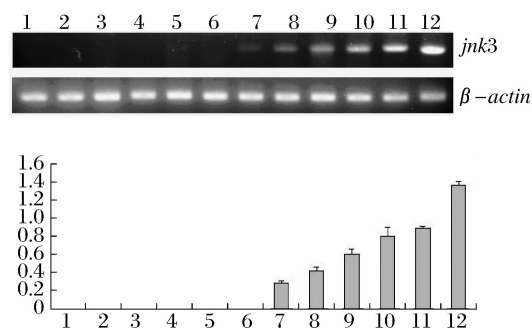


图7 *jnk3* 在斑马鱼不同发育时期胚胎 mRNA 水平的表达

1. 两细胞期; 2. 多细胞期; 3. 囊胚期; 4. 原肠胚期; 5. 神经胚; 6. 视原基; 7. 脑泡期; 8. 肌肉效应期; 9. 心跳期; 10. 眼色素期; 11. 体色素期; 12. 出膜期。

Fig. 7 The mRNA expression of *jnk3* in zebra fish embryo

1. two cells stage; 2. multi-cells stage; 3. blastula; 4. gastrula; 5. neurula; 6. optic primordium; 7. brain vesicle; 8. muscle movement; 9. heart-beat; 10. eye pigmentation; 11. body pigmentation; 12. hatching larvae.

3 讨论

JNK 通路是真核细胞中重要的信号通路,许多研究证实 JNK 家族参与哺乳动物组织器官发育调控^[1-6]。通过同源克隆的方法,本文首次获得了金鱼的 *jnk3* 基因 cDNA 全序列 (GenBank accession number FJ183484)。使用 BioEdit 7.0 对金鱼以及 GenBank 中已发表的斑马鱼、非洲爪蟾、小鼠、牛、人等 6 种脊椎动物的 *jnk3* 基因序列及其推导的氨基酸序列同源性分析表明, *jnk3* 基因在脊椎动物中具有较高的保守性。用 MEGA 3.1 构建 6 种脊椎动物 *jnk3* 基因的系统发育树 (图 8)。金鱼与斑马鱼 *jnk3* 基因处于同一分支上, *jnk3* 基因的系统发育关系与传统的动物分类基本一致,值得注意的是,哺乳类中已报道的牛 *jnk3* 基因与其他 5 种动物相去甚远,独立成为一支。

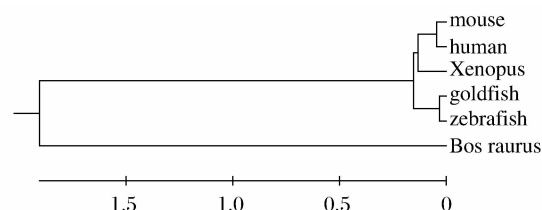


图8 6 种脊椎动物 *jnk3* 基因系统发育树

Fig. 8 Phylogenetic tree of *jnk3*

在脊椎动物中,*jnks* 基因家族中 *jnk1* 和 *jnk2* 基因在组织内广泛表达^[8-9]。研究显示 *jnk3* 基因特异表达于鱼类脑和精巢组织中,特别是在脑组织中高量表达。这一结果与已报到的哺乳动物中的研究基本相一致,*jnk3* 基因都表现出高度组织特异性表达的特性。*jnk3* 基因在金鱼和斑马鱼胚胎发育中的分化表达研究表明,*jnk3* 基因在金鱼、斑马鱼胚胎发育早期没有表达,神经胚之后 *jnk3* 基因开始表达,该结果进一步证实 *jnk3* 基因的表达与鱼类神经系统的发育密切相关。近年来研究发现,*jnk3* 基因参与哺乳动物神经细胞凋亡的调控,在帕金森综合症、阿尔茨海默和中风等神经退行性疾病中发挥着重要作用^[11,14]。在 19 种来源于人脑瘤细胞的细胞系中均未能检测到 *jnk3* 基因的表达^[7],其研究表明 *jnk3* 基因表达的缺失可能对于脑瘤的产生起着重要的作用。值得关注的是,在斑马鱼心脏组织中检测到 *jnk3* 基因的表达,然而在金鱼心脏中却未检测到。

JNK 家族采用 MAPK 家族高度保守的三级激酶级联传递信号 (JNKKK→JNKK→JNK),以此将细胞外信号逐级放大并传导到细胞内乃至细胞核,把膜受体结合的胞外刺激物与细胞质和细胞核的效应分子连接起来^[1,15-16]。JNK 通过对底物的磷酸化和去磷酸化,调节下游效应分子的活性^[4,17],继而启动某些效应基因的转录^[18-20]。新近报道了哺乳动物生殖细胞发育调控蛋白 SPAG9 (novel human sperm-associated antigen 9) 的功能与 JNKs 密切关联,表明 JNKs 可能参与生殖细胞的分化调控^[21-22]。RT-PCR、Western blot、免疫组织化学技术检测黄鳝不同生殖发育时期生殖腺中 *jnk1* 基因的表达,发现 *jnk1* 基因在黄鳝卵巢中 mRNA 及蛋白表达水平非常高;随着卵巢组织的退化和精巢组织发育,间性腺中 *jnk1* 基因的表达呈下调性变化;至雄性阶段,*jnk1* 基因在精巢中的表达则进一步被抑制^[23]。JNK 蛋白特异性抑制剂处理,进一步确定了 JNK 在鱼类卵巢及卵母细胞发育中具有重要的调控功能(待发表)。本研究中亦发现 *jnk3* 基因在鱼类雌、雄性腺中的表达也存在着显著差异:精巢组织中有显著表达,而在卵巢组织中未检测到,提示 *jnk3* 基因可能是鱼类精巢组织分化和发育的重要调控基因。进一步确定 JNK 家族在鱼类性别决定和性腺发育中的功能,并深入研究它们在鱼类生殖发育中的相

关调控机制,势必为掌握鱼类性腺分化过程及机理提供新的线索和基础。

参考文献:

- [1] DAVIS R J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases[J]. Cell,2000,103:239-252.
- [2] LIN A. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the break on apoptosis [J]. Bioessays, 2003,25:1-8.
- [3] MARIE A B. The isoform-specific functions of the c-Jun N-terminal Kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting [J]. Bioessays,2006,28:923-934.
- [4] HIBI M. Identification of an oncoprotein and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain [J]. Genes & Dev,1993,7:2135-2148.
- [5] KALLUNKI T B, SU I, TSIGELNY H K, et al. JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation [J]. Genes Dev, 1994, 8:2996-3007.
- [6] GUPTA S, BARRETT T, WHITMARSH A J, et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors [J]. EMBO J, 1996, 15:2760-2770.
- [7] YOSHIDA S, FUKINO K, HARADA H, et al. The c-Jun NH2-terminal kinase 3 (JNK3) gene: genomic structure, chromosomal assignment, and loss of expression in brain tumors [J]. J Human Genet, 2001,46:182-187.
- [8] KUAN C Y, YANG D D, SAMANTA D R, et al. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development [J]. Neuron,1999,22:667-676.
- [9] SABAPATHY K, JOCHUM W, HOCHEDINGER K, et al. Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2 [J]. Mech Dev,1999,89:115-124.
- [10] YANG D D, KUAN C Y, WHITMARSH A J, et al. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *Jnk3* gene [J]. Nature,1997,389:865-870.
- [11] CHOI W S, ABEL G, KLINTWORTH H, et al. JNK3 mediates paraquat- and rotenone-induced dopaminergic neuron death [J]. J Neuropathol Exp Neurol,2010,69(5):511-520.

- [12] 刘文彬,刘姣,马海立,等. 蛋白磷酸酶 PP-1c 在不同倍性鱼 6 种组织中的分化表达模式[J]. 水产学报,2009,33(5):847-851.
- [13] 郑春兵,马海立,付虎,等. 金鱼“PP2A-B”家族 Alpha 和 Gamma 调节基因的 cDNA 克隆及 RNA 表达[J]. 自然科学进展,2009,19(2):36-42.
- [14] RESNICK L, FENNELL M. Targeting JNK3 for the treatment of neurodegenerative disorders [J]. *Drug Discov Today*, 2004, 9(21):932-939.
- [15] SHAULIAN E, KARIN M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat* [J]. *Cell Biol*, 2002, 4: 131-136.
- [16] POLASKI S, WHITNEY L, BARKER B W, *et al.* Genetic analysis of slipper/mixed lineage kinase reveals requirements in multiple Jun-N-terminal kinase-dependent morphogenetic events during *Drosophila* development [J]. *Genetics*, 2006, 174(2):719-733.
- [17] LEE K, SONG K. Basal c-Jun N-terminal kinases promote mitotic progression through histone H3 phosphorylation [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(2): 216-221.
- [18] PULVERER B J, KYRIAKIS J M. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases [J]. *Nature*, 1991, 353:670-673.
- [19] KARIN M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270:16483-16486.
- [20] SHEPHERD E G, ZHAO Q, WELTY S E, *et al.* The function of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in peptidoglycan-stimulated macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(52): 54023-54031.
- [21] JAGADISH N, RANA R, SELVI R, *et al.* Characterization of a novel human sperm-associated antigen 9 (SPAG9) having structural homology with c-Jun- N-terminal kinase-interacting protein [J]. *Biochem J*, 2009, 389:73-82.
- [22] BINÉTRUY B, HEASLEY L, BOST F, *et al.* Concise review: regulation of embryonic stem cell lineage commitment by mitogen-activated protein kinases [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(5):1090-1095.
- [23] XIAO Y M, CHEN L L, LIU J, *et al.* JNK1 downregulation is associated with sex reversal of the ricefield eel [J]. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)*, 2010, 314B:242-256.

The tissue-specific and temporal expression patterns of *jnk3* gene in *Carassius auratus auratus* and *Danio rerio*

CHEN Li-li^{1,2#}, ZOU Li-jun^{1#}, XIONG Zhen¹, LIU Jiao¹, LIAO Gao-peng¹,
LIU Wen-bin¹, LIU Shao-jun¹, XIAO Ya-mei^{1*}, LI David wan-cheng^{1,3*}

(1. Key Lab of Protein Chemistry and Developmental Biology of Education Ministry of China,
College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China;

2. Center Laboratory of Biotechnology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China;

3. Departments of Biochemistry and Molecular Biology, Ophthalmology and Visual Sciences,
University of Nebraska Medical Center, Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198 – 5870)

Abstract: The c-Jun N-terminal kinases (JNKs) are the members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family and play important roles in mediating the environmental stress responses. Previous studies have shown that JNKs regulate development of vertebrates, especially axis development. Our recent studies have also shown that JNK1 is implicated in control of sex reversal of the ricefield eel. To further explore the functions of JNKs in control of development, we have cloned *jnk3* from goldfish, and compared the tissue-specific and temporal expression patterns in both goldfish and zebrafish. Our results show that the full length of *jnk3* cDNA from gold fish contains an open reading frame (ORF) of 1 293 bp coding for a deduced protein of 414 amino acids. The goldfish *jnk3* cDNA is 94.1% identical with that from zebrafish, and 80.7% with that from human. The amino acid sequences are 99.7% identical between goldfish and zebrafish, and 93.4% between goldfish and human. *jnk3* is highly expressed in the brain and to a much less degree, in the testis of adult goldfish. In zebrafish, *jnk3* is also expressed in the two tissues with similar pattern. In addition, *jnk3* is expressed at moderate level in the heart of zebrafish. During development of goldfish and zebrafish, *jnk3* mRNA is initially detectable at the neurula stage, then has gradually increased from neurula to heart-beating stage, and maintains at high level from heartbeating to hatching larvae. Together, these results suggest that *jnk3* may be important for the later development of fish embryos and also functions in adult tissues including brain, heart and testis.

Key words: goldfish (*Carassius auratus auratus*); zebrafish (*Danio rerio*); JNK3; embryonic development

Corresponding author: XIAO Ya-mei. E-mail: yameix@126.com;

LI David wan-cheng, E-mail: dwli1688@hotmail.com

#CHEN Li-li and ZOU Li-jun contributed equally to this work.