

## 尼罗罗非鱼雌雄鱼肌肉组织差异表达基因的筛选

吴奎<sup>1,2</sup>, 梁宏伟<sup>2</sup>, 李忠<sup>2</sup>, 王丹<sup>2</sup>, 王春枝<sup>1,2</sup>, 邹桂伟<sup>1,2\*</sup>

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223)

**摘要:**应用引物退火控制技术(ACP)筛选尼罗罗非鱼雌雄鱼肌肉组织差异表达基因,寻找与雌雄鱼肌肉生长发育相关的候选基因。本实验从同等条件下养殖的尼罗罗非鱼群体中随机选取雌、雄鱼各5尾组成RNA池,采用引物退火控制技术,分析了两组个体肌肉组织差异表达基因。利用20对随机引物差异显示扩增,共获得8条ESTs,其中5个已知的ESTs分别为转录变体3(LOC100691543)、60S核糖体蛋白(RL3)、小白蛋白β样蛋白、肌型肌酸激酶M2-CK和转录因子Sox4,其余3个为未知的ESTs。实时定量PCR分析各差异表达基因在尼罗罗非鱼雌雄鱼肌肉组织中的表达发现,8个差异表达基因中转录变体3与ACP6-Y在尼罗罗非鱼雄鱼肌肉组织中的表达均极显著高于雌鱼( $P < 0.01$ ),ACP3-X、60S核糖体蛋白(RL3)、小白蛋白β样蛋白、ACP15-X、肌型肌酸激酶M2-CK与转录因子Sox4在尼罗罗非鱼雌鱼肌肉组织中的表达均极显著高于雄鱼( $P < 0.01$ )。结果表明,应用引物退火控制技术筛选获得了8个可能参与了雌雄鱼肌肉生长发育调控的ESTs,为进一步筛选雌雄鱼肌肉生长发育相关候选基因奠定了基础。

**关键词:**尼罗罗非鱼;肌肉组织;差异性表达基因;引物退火控制技术(ACP)

**中图分类号:**Q 785; S 965

**文献标志码:**A

引物退火控制技术(annealing control primer, ACP)是在mRNA差异显示技术(DDRT-PCR)基础上发展起来的一种克隆差异表达基因的方法<sup>[1]</sup>。ACP技术所需引物有3个组成部分,3'端部分是由10个碱基的随机引物序列组成核心的部分,5'端部分是由20个碱基组成的通用序列,引物中间部分是由一个较低Tm值区域构成的调节子部分<sup>[2]</sup>。ACP技术需进行两步PCR,第一个循环是利用3'端核心引物部分与靶底物结合,而引物中间的调节子部分会形成泡状结构,能够阻止5'端通用引物序列与模板非特异性结合;第二个循环退火温度提高,利用5'端通用引物序列为有效引物,以第一个循环PCR产物为模板,扩增第一个循环所得专一性PCR产物<sup>[1]</sup>。由于调节子部分特殊的结构能够有效地阻止通用引物序列与模板非特

异性的结合,ACP技术中PCR产物的假阳性会大大降低<sup>[3]</sup>。近年来,ACP技术已经在哺乳动物和水产动物发育、抗病与性别相关差异表达基因的克隆中得到了广泛的应用<sup>[4-7]</sup>。

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)属于鲈形目(Perciformes)、丽鱼科(Cichlidae)、罗非鱼属(*Tilapia*),是世界性的主要水产养殖对象之一<sup>[8]</sup>。自然界中,尼罗罗非鱼主要是XX/XY性别决定系统,而温度和常染色体等也会影响性别决定<sup>[9]</sup>。尼罗罗非鱼雌雄鱼在体型、生长速度等性状方面存在较大的差异,尼罗罗非鱼雄鱼较雌鱼生长速度更快、个体更大<sup>[10]</sup>。动物机体生长发育是遗传因素与环境共同作用的结果,动物的肌肉发育涉及到生长发育、脂肪沉积、能量代谢等非常复杂的生命活动,表达过程包含着复杂的基因调控和多种代谢途径<sup>[11]</sup>。生长发育与分子代谢

收稿日期:2013-09-13

修回日期:2013-11-25

资助项目:公益性行业(农业)科研专项(200903046-02)

通信作者:邹桂伟,E-mail:zougw@yfi.ac.cn

存在密切关系,而肌肉生长发育和分子代谢是十分复杂的生命活动,受多基因、多途径、多阶段的影响<sup>[12]</sup>,找到影响肌肉生长发育的相关基因有利于提高鱼类生产性能。利用差异显示技术,在生产性能有显著差异的群体间,能够快速找到一系列 mRNA 水平上的差异表达基因片段,进而找到与该种生产性状高度相关的基因<sup>[13]</sup>。本实验采用 ACP 技术,对尼罗罗非鱼雌雄肌肉组织 cDNA 进行基因差异表达研究,并进行序列分析,为进一步筛选雌雄鱼肌肉生长发育相关候选基因提供一些理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料与试剂

实验用的尼罗罗非鱼取自中国水产科学研究院长江水产研究所窑湾试验场,同等条件下养殖的尼罗罗非鱼雌、雄鱼各 5 尾,雌鱼体质量(250 ± 10)g,雄鱼体质量(500 ± 10)g。活体解剖后取等量背肌,每次采样的部位保持一致,置于液氮中速冻,5 尾雌鱼、5 尾雄鱼的肌肉组织分开研磨均匀后分装, -80 °C 保存。

GeneFishing™ DEG Premix 试剂盒购自纽罗西敏生物科技(杭州)有限公司, M-MLV 购自 promega 公司, SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司, pMD18-T 载体和 TaKaRa PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser(perfect real time)100 reactions 反转录试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司, 2 × SYBR real-time PCR premixture 为 Bioteke 公司产品。

### 1.2 总 RNA 的提取及检测

分别取尼罗罗非鱼雌、雄鱼的肌肉组织混合样品 50 ~ 100 mg,用 TRIzol 法提取样品总 RNA, -80 °C 保存备用;取适量 RNA,溶解于 10 μL 无 Rnase 的水中。取 3 μL 加入 1 μL 上述缓冲液进行琼脂糖凝胶电泳,检测 RNA 的完整性,用紫外分光光度计检测其纯度。

### 1.3 反转录合成 cDNA 第一条链

分别在两个 0.5 mL 的 PCR 管中进行雌性和雄性个体的反应,反应体系如下:3 μg 总 RNA, 1 μL 10 mmol/L dT-ACP1,加入无 RNA 酶的水至总体积 14 μL,混合均匀;70 °C 孵育 5 min,冰浴 2 min;在两个管中分别加入以下反应体系:5 ×

RT buffer 4 μL, 10 mmol/L dNTP 1 μL, 200 U/μL M-MLV 逆转录酶 1 μL,混合均匀;然后 42 °C 90 min;94 °C 2 min;合成的雌、雄个体肌肉组织 cDNA 第一条链分别用无 DNA 酶的水稀释 10 倍, -20 °C 保存备用。

### 1.4 20 对 ACP 随机引物筛选雌雄鱼肌肉组织差异表达基因

ACP 方法所用到的 20 对随机引物和 dT-ACP 引物见表 1,PCR 反应体系如下(PCR 反应所需引物和试剂由 GeneFishing™ DEG Premix 试剂盒提供):1 μL cDNA( ~ 50 ng), 2 μL 5 μmol/L arbitrary ACP(one of the arbitrary ACPs), 1 μL 10 μmol/L dT-ACP2, 6 μL Distilled water, 10 μL 2 × SeeAmp™ ACP™ Master Mix, 共 20 μL;在冰上加好样后将 PCR 管放入预热(94 °C)的 PCR 扩增仪中执行以下 PCR 扩增反应程序:94 °C 5 min, 50 °C 2 min, 72 °C 2 min, 1 个循环;94 °C 40 s, 65 °C 40 s, 72 °C 40 s, 40 个循环;72 °C 5 min, 4 °C 5 min;取上述各 PCR 产物 10 μL 电泳,检测扩增结果。

### 1.5 基因克隆与序列分析

根据尼罗罗非鱼雌雄个体 PCR 产物电泳检测结果,使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收纯化差异片段,然后进行连接和转化,挑取阳性克隆质粒送武汉擎科创新生物科技有限公司测序。获得的序列利用 BLASTn 和 BLASTx( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行比对。

### 1.6 实时定量 PCR 分析

应用 Primer Premier 5 软件对获得的差异表达基因序列以及 NCBI 公布的罗非鱼 *β-actin* 基因序列(登录号:AB037865.1)设计引物见表 2,取尼罗罗非鱼雌雄鱼肌肉组织总 RNA,用 TaKaRa PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser(perfect real time)100 reactions 反转录试剂盒根据说明反转录合成第一链 cDNA 后进行实时定量 PCR,定量 PCR 扩增在 Rotor-Gene Q real-time Cycler 上进行,荧光染料采用的是 2 × SYBR real-time PCR Premixture,本实验所用的反应体系为 20 μL。实验采用三步法 real-time PCR 反应程序,利用定量 PCR 仪自带的 Rotor-Gene Q Series Software 1.7 软件进行数据分析,采用的方法为基因表达定量分析中常用的  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  相对定量法<sup>[14]</sup>,其中  $C_t$  值为与设定阈值相交时的循环数,

所有实验样本均设3次重复,利用SPSS 15.0软件进行样品间的差异水平分析, $P < 0.05$ 表示显著差异, $P < 0.01$ 表示极显著差异。

表1 ACP方法所用PCR引物序列  
Tab.1 Primer sequence used in cDNA synthesis and ACP<sup>TM</sup>-based PCR

引物 primer	序列 primer sequence
dT-ACP1	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXXX(T) <sub>18</sub> -3'
dT-ACP2	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXXX(T) <sub>15</sub> -3'
ACP1	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCCATCGACC-3'
ACP2	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXAGGCGATGCC-3'
ACP3	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCCGGAGGATG-3'
ACP4	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCTGCTCGCG-3'
ACP5	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXAGTGCCTCG-3'
ACP6	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGGCCACATCG-3'
ACP7	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTGCGGATCG-3'
ACP8	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGGTCACGGAG-3'
ACP9	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGATGCCGCTG-3'
ACP10	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXTGGTCGTGCC-3'
ACP11	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTGCAGGACC-3'
ACP12	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXACCGTGGACG-3'
ACP13	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCTTACCAGC-3'
ACP14	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCAAGTCGGC-3'
ACP15	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCCACCGTGTG-3'
ACP16	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGTCGACGGTG-3'
ACP17	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCAAGCCACG-3'
ACP18	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCGGAGCATCC-3'
ACP19	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTCTGCGAGC-3'
ACP20	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGACGTTGGCG-3'

表2 实时定量引物序列信息  
Tab.2 Primer information for real-time PCR

基因 gene	引物 primer	产物长度/bp product length
ACP3-X	F:5'-GGAGGATGCTGAATGTG-3' R:5'-TTCGTTGTCAGAGTCACAG-3'	94
ACP5-Y	F:5'-GGAGATGGCTTTGAAGTGTG-3' R:5'-GTAGGAAGCAAGCAGAGGGAG-3'	88
ACP6-Y	F:5'-ATCGCATCTTCTCTACTTC-3' R:5'-TGTTTCTAGCCAGCCGGTGA-3'	67
ACP12-X	F:5'-AGGCCTTCATGGGTCCGCTCA-3' R:5'-TTATTAACATTCTGCAGCACT-3'	112
ACP14-X	F:5'-AGCGGTTTCATTGAGGAGGAC-3' R:5'-AATGTGGGCATTGTTGTTCCA-3'	217
ACP15-X	F:5'-GAACTCGTGAACGGGCTCCTA-3' R:5'-GTGATTGGTCAGTTGGCTTGG-3'	133
ACP18-X	F:5'-GAGCATCCTGGGATCAATCCA-3' R:5'-TGATTCTCATATGGGGCATCA-3'	121
ACP19-X	F:5'-ATGGAGCTGCTGCGCTTTCTC-3' R:5'-GGCGAGGTTCTCGTTGTTGTG-3'	86
$\beta$ -actin	F:5'-CGGAATCCACGAAACCACCTA-3' R:5'-CCAAGGAAGGAAGGCTGGAAG-3'	205

## 2 结果

### 2.1 尼罗罗非鱼雌雄鱼肌肉差异表达基因

总 RNA 的提取结果 分别取 3  $\mu$ L 尼罗罗非鱼 5 尾雌鱼、5 尾雄鱼的肌肉组织混合样品总 RNA 样,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳(图 1),RNA 纯度用紫外分光光度计测定, $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  值为 1.9~2.0, RNA 质量良好。

ACP 方法获得的尼罗罗非鱼雌雄鱼肌肉差异表达基因 本实验共扩增到 8 个差异表达基因(图 2),其中用 ACP5 与 ACP6 引物扩增到了 2 个雄性个体肌肉组织差异表达基因,利用 ACP3、ACP12、ACP14、ACP15、ACP18 与 ACP19 引物在雌性个体肌肉组织中获得了 6 个差异表达基因。

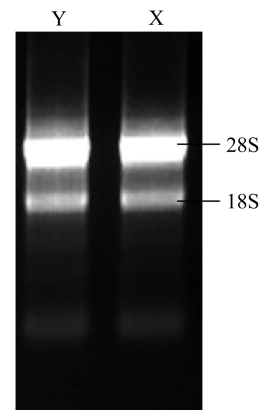


图 1 尼罗罗非鱼肌肉组织总 RNA

Y. 雄性; X. 雌性

Fig. 1 The total RNA of Nile tilapia muscle tissue

Y. male; X. female

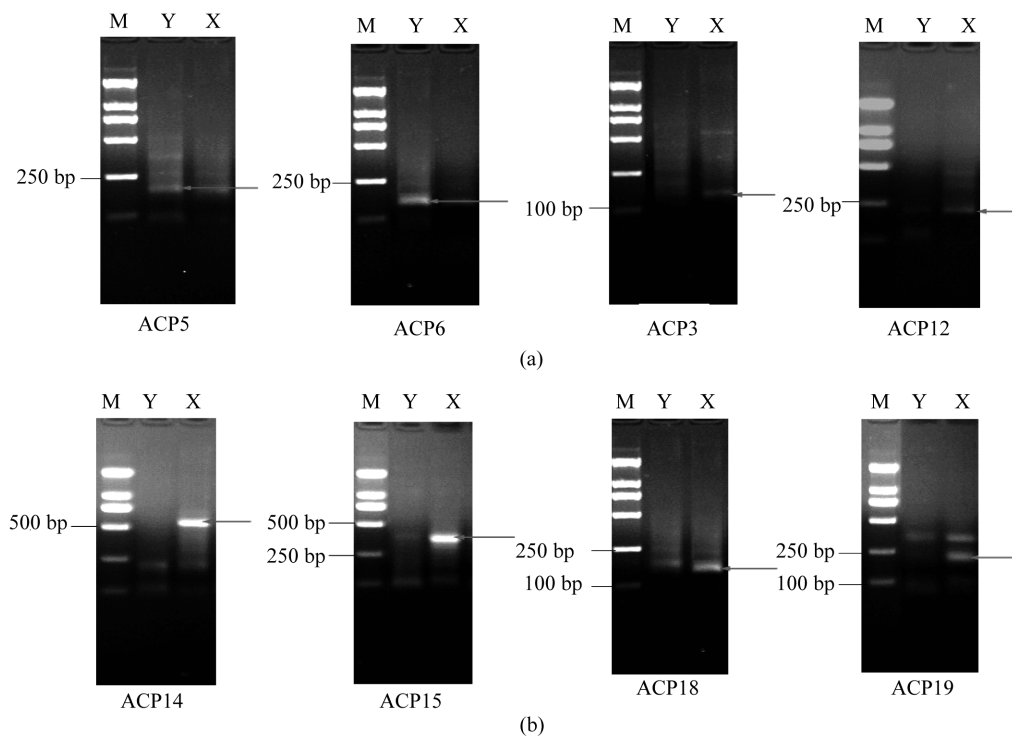


图 2 差异表达基因片段筛选电泳图

(a) ACP5、ACP6、ACP3、ACP12 电泳结果; (b) ACP14、ACP15、ACP18、ACP19 电泳结果; Y. 雄性; X. 雌性; M. Marker; 箭头表示目的基因条带

Fig. 2 Agarose electrophoresis of differentially expressed gene screening

(a) The electrophoresis results of ACP5, ACP6, ACP3 and ACP12; (b) The electrophoresis results of ACP14, ACP15, ACP18 and ACP19; Y. male; X. female; M. Marker; Arrow indicates the target gene band

差异表达序列的比对结果 将各个序列在 NCBI 进行比对,8 个差异表达基因中有 5 个为已知基因,其中 ACP5-Y 为转录变体 3 (*LOC100691543*)、ACP12-X 为 60S 核糖体蛋白

L3、ACP14-X 为小白蛋白  $\beta$  样蛋白、ACP18-X 为肌型肌酸激酶 *M2-CK*、ACP19-X 为转录因子 *Sox4*,而 ACP3-X、ACP6-Y 与 ACP15-X 为 3 个未知基因(表 3)。

表 3 差异表达基因的比对结果  
Tab. 3 Differentially expressed genes alignment results

基因 gene	同源基因 highest homology	物种 species	长度/bp length	一致性 consistency	表达模式 expression pattern
ACP3-X	—	—	140	—	下调 down-regulated
ACP5-Y	转录变体 3 (LOC100691543) <i>transcript variant3 (LOC100691543)</i>	尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	125	111/113 (98%)	上调 up-regulated
ACP6-Y	—	—	109	—	上调 up-regulated
ACP12-X	60S 核糖体蛋白 L3 (RL3) <i>60S ribosomal protein L3 (RL3)</i>	斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	155	139/171 (81%)	下调 down-regulated
ACP14-X	小白蛋白 $\beta$ 样蛋白 <i>parvalbumin beta-like</i>	尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	492	469/471 (99%)	下调 down-regulated
ACP15-X	—	—	312	—	下调 down-regulated
ACP18-X	肌型肌酸激酶 M2-CK <i>muscle-type creatine kinase M2-CK</i>	莫桑比克罗非鱼 <i>Oreochromis mossambicus</i>	138	130/134 (97%)	下调 down-regulated
ACP19-X	转录因子 Sox4 <i>transcription factor Sox4 (Sox4)</i>	红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	244	112/145 (77%)	下调 down-regulated

注: ACP3-X、ACP6-Y、ACP15-X 为未知序列, 上调与下调指肌肉生长

Notes: ACP3-X, ACP6-Y, ACP15-X are unknown sequence, up-regulated and down-regulated represents the growth of muscle

## 2.2 实时定量 PCR 结果

以尼罗罗非鱼  $\beta$ -actin 基因为对照, 以尼罗罗非鱼雌雄鱼肌肉组织总 RNA 逆转录后的 cDNA 为模板进行实时定量 PCR 反应(图 3)。ACP5-Y 为转录变体 3 (LOC100691543) 与未知基因 ACP6-Y 在尼罗罗非鱼雌雄鱼肌肉组织中的表达差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 且两者在雄鱼肌肉组织中的表达量均高于雌鱼; 其余的 6 个基因中 ACP12-X 为 60S 核糖体蛋白 L3、ACP14-X 为小白蛋白  $\beta$  样蛋白、ACP18-X 为肌型肌酸激酶 M2-CK、ACP19-X 为转录因子 Sox4, 而 ACP3-X 与 ACP15-X 未知基因, 在雌鱼肌肉组织中的表达极显著高于雄鱼 ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

1992 年, Liang 等<sup>[15]</sup>发明 mRNA 差异显示技术 (DDRT-PCR) 以来, 国内外学者陆续发展了诸如代表性差异分析 (representational difference analysis, RDA)、抑制性差减抑制杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH)、基因芯片技术 (DNA chip technique)、cDNA-AFLP 技术等多种分离和克隆差异表达基因的方法, 但

这些方法自身存在着操作技术较为繁琐、工作量大、假阳性高等不同的缺点<sup>[16-19]</sup>。本实验采用的 ACP 技术能降低实验过程中假阳性结果的出现, 增强 PCR 产物的特异性, 其操作简单、速度快且经济实惠, 还可以在较短时间内克隆到有效的差异表达基因<sup>[6]</sup>。利用该方法对尼罗罗非鱼雌雄鱼肌肉组织基因的差异表达情况进行研究可以取得较为可靠的结果。目前国内外的一些实验室已经通过 ACP 技术取得了许多成果。田万年等<sup>[20]</sup>应用 20 对 ACP 引物在肌内脂肪含量差异极显著的延边黄牛背最长肌肉组织中筛选得到了 12 个可能参与了肌内脂肪沉积调控的 ESTs, 为进一步筛选肌内脂肪沉积相关的基因奠定了基础。Kim 等<sup>[4]</sup>利用 120 对 ACP 引物获得了 31 个人类脐静脉上皮细胞衰老过程中的差异表达基因, 进一步研究发现 29 个已知基因中 CD9 抗原、重组 MHC I 类链相关序列 A (MICA) 和 CDC37 基因能够使细胞衰老上调, 而骨形态发生蛋白 4 (BMP4)、Dickkopf-1 (DKK1)、转录因子 7-1 (TCF7L1) 基因能够下调细胞衰老。Hwang 等<sup>[5]</sup>获得了在牛的孵化囊胚早期囊胚的 9 个差异表达基因, 其中 4 个为已知基因, 5 个为 ESTs, 包括核糖体蛋白 S12 基因 (RPS12) 和核糖体蛋白 L125 (RPL12) 基因。Hwang 等<sup>[21]</sup>获得了 9 个猪单性

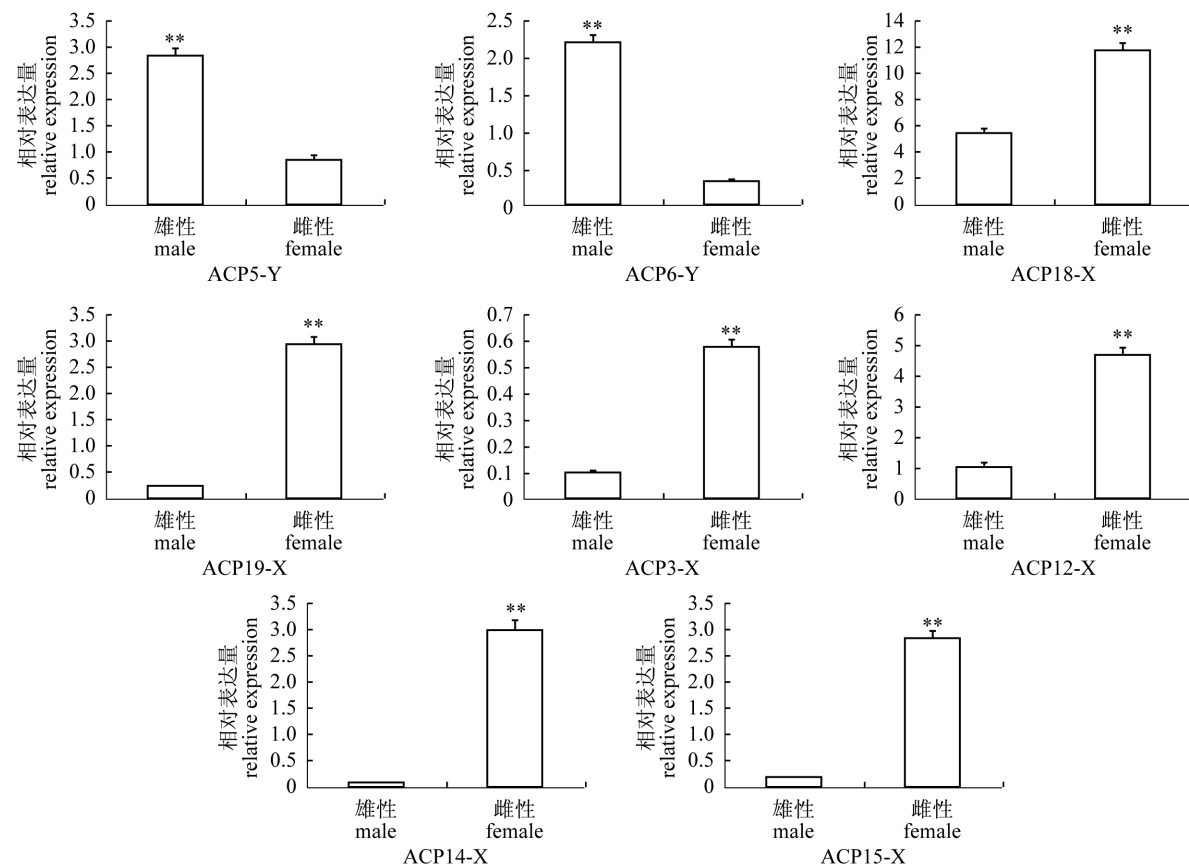


图3 各基因在尼罗罗非鱼雌雄鱼肌肉组织中的表达分析

\*\* 表示极显著差异 ( $P < 0.01$ )

Fig. 3 The expression of each gene in muscle tissue of male and female Nile tilapia

\*\* indicate significant differences ( $P < 0.01$ )

生殖2细胞期与胚泡期胚胎中的差异表达基因,均为已知基因或ESTs,实时定量研究结果表明这9个基因均在早期卵裂过程中扮演着重要的角色。谢芳靖等<sup>[6]</sup>成功地克隆到1个1360 bp纤维蛋白原 $\beta$ 链基因长片段的抗病候选基因。沈冰玲<sup>[7]</sup>获得8个日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)精巢与卵巢差异表达基因,其4个已知基因中凝血酶敏感蛋白基因(*thrombospondin*)和皮质棒蛋白基因(*cortical rod protein-2*)为在日本囊对虾卵巢中显著表达的基因,而增殖细胞核抗原基因(*proliferating cell nuclear antigen*)和泛素缀合酶基因(*ubiquitin-conjugating enzyme 2r*)在精巢的表达量高于卵巢。

本实验在同等条件下养殖的尼罗罗非鱼群体中,应用引物退火控制技术在尼罗罗非鱼雌雄鱼肌肉组织中获得8条表达差异序列片段。实时定量PCR是对模板DNA进行定量研究的方法,具

有可实时监测、高特异性、高灵敏性和高精确性的特点,是一种检测基因差异表达的快速有效的方法<sup>[22]</sup>。本实验应用实时定量PCR技术对8个基因进行了在雌雄鱼肌肉组织中的表达分析,结果表明,鉴定的8个基因均可作为雌雄鱼肌肉生长发育相关的候选基因,以做进一步的分析研究。

在筛选到的差异表达基因中,60S核糖体蛋白L3属于L3P核糖体蛋白家族,位于细胞质中。核糖体蛋白主要在蛋白质合成中发挥作用,但它们还在细胞的增殖、凋亡、发育的多种调控与恶性转化等方面发挥作用<sup>[23]</sup>。本实验进一步揭示60S核糖体蛋白L3基因可能参与了尼罗罗非鱼雌雄鱼肌肉生长发育的调控。肌酸激酶(*creatine kinase, CK*)能够催化磷酸基在二磷酸腺苷ADP与磷酸肌酸之间的可逆性转移,是心脏与肌肉等组织能量代谢过程中重要的作用因子,广泛分布于脊椎动物与无脊椎动物<sup>[24]</sup>。脊椎动物肌酸激

酶有胞质型 (cytosolic form) 和线粒体型 (mitochondrial form) 两大类型<sup>[25]</sup>, 本实验中肌型肌酸激酶 *M2-CK* 为胞质型肌酸激酶。Sun 等<sup>[26]</sup> 在鲤 (*Cyprinus carpio*) 肌肉文库中得到了 3 种不同的 *M-CK* cDNA, 这 3 种 *M-CK* 主要在肌肉中表达, 心脏中有微弱表达, 脑、肾、鳃和肝脏中并未发现表达。另外, 肌型肌酸激酶 *M-CK* 在鳃肌肉、心脏、皮肤、卵巢、肾脏与胃组织中均有表达, 在眼、肝脏和脑组织中 *M-CK* 有微弱表达, 表明这些组织的能量代谢过程有肌型 *M-CK* 的参与, 其可能是 PCr/ATP 平衡主要的调控因子<sup>[27]</sup>。可将 60S 核糖体蛋白 *L3* 和肌型肌酸激酶 *M2-CK* 作为影响尼罗罗非鱼雌雄鱼肌肉生长的候选基因进行研究。

小白蛋白最先是从小白蛋白从蛙与鱼的肌肉中分离出来的, 是一种水溶性酸性蛋白质, 其分子量大约 12 ku, 但由于其分子较小和有较高的水溶性, 称之小白蛋白, 是一种特异性神经元内蛋白质, 其作用机理的一个推测是参与钙离子和镁离子平衡调控<sup>[28]</sup>, 但有关小白蛋白  $\beta$  样蛋白对尼罗罗非鱼肌肉生长发育的影响还尚未见报道。本实验中小白蛋白  $\beta$  样蛋白下调尼罗罗非鱼肌肉生长发育, 提示小白蛋白  $\beta$  样蛋白的表达与尼罗罗非鱼肌肉生长发育存在一定的关系, 但小白蛋白  $\beta$  样蛋白, 是否在尼罗罗非鱼肌肉生长发育调控中发挥重要作用, 有待进一步研究。*Sox4* 基因是 *Sox* 家族的重要成员, 人类 *Sox4* 基因可在脑、心和睾丸组织中大量表达, 推测其功能不仅与性腺功能有关, 还参与了许多动物生长发育过程, 如胚胎期心脏、中枢神经系统以及胸腺的发育, 还有 B、T 淋巴细胞的分化与成熟等过程<sup>[29-32]</sup>。本实验中 *Sox4* 基因下调尼罗罗非鱼肌肉生长发育, 显示该基因的表达与尼罗罗非鱼肌肉生长发育存在一定的关系, 但 *Sox4* 基因是否在尼罗罗非鱼肌肉生长发育调控中发挥重要作用, 有待进一步研究。本实验中转录变体 3 (*LOC100691543*) 上调尼罗罗非鱼肌肉生长发育, 表明该基因的表达与尼罗罗非鱼肌肉生长发育可能存在一定的关系, 另外, 有 3 个未知的 ESTs 在尼罗罗非鱼雌雄鱼肌肉组织中差异表达, 这些基因或许在尼罗罗非鱼肌肉生长发育调控中发挥着重要的作用。因为本实验只用了 20 对 ACP 引物组合进行差异表达研究, 所检测的差异片段只有部分是与肌肉生长相关的基

因, 下一步研究应加大随机引物数量进行筛选。

#### 参考文献:

- [1] Hwang I T, Kim Y J, Kim S H, *et al.* Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification[J]. *Biotechniques*, 2003, 35(6): 1180 - 1184.
- [2] Ohtsuka E, Matsuka S, Ikehara M, *et al.* An alternative approach to deoxyoligonucleotides as hybridization probes by insertion of deoxyinosine at ambiguous codon positions [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260(5): 2605 - 2608.
- [3] Kim Y J, Kwak C I, Gu Y Y. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels [J]. *Biotechniques*, 2004, 36(3): 424 - 434.
- [4] Kim T W, Kim H J, Lee C, *et al.* Identification of replicative senescence-associated genes in human umbilical vein endothelial cells by an annealing control primer system [J]. *Experimental Gerontology*, 2008, 43(4): 286 - 295.
- [5] Hwang K C, Cui X S, Park S P, *et al.* Identification of differentially regulated genes in bovine blastocysts using an annealing control primer system [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2004, 69(1): 43 - 51.
- [6] Xie F J, Zhang Z P, Lin P, *et al.* Application of annealing control primer system to cloning of differentially expressed genes [J]. *Marine Sciences*, 2007, 31(5): 70 - 75. [谢芳靖, 张子平, 林鹏, 等. 引物退火控制技术在差异表达基因克隆中的应用. *海洋科学*, 2007, 31(5): 70 - 75.]
- [7] Shen Y L. Identification and Characterization of differentially expressed genes in ovary and testis of *Marsupenaeus japonicus* [D]. Xiamen: Jimei University, 2008. [沈冰玲. 日本囊对虾雌雄性腺差异表达基因的克隆与分析. 厦门: 集美大学, 2008.]
- [8] Li S F. Development countermeasures of tilapia culture industry in China mainland [J]. *Chinese Fisheries Economics and Research*, 1999(1): 13 - 15. [李思发. 中国大陆罗非鱼养殖业发展对策. *中国渔业经济研究*, 1999(1): 13 - 15.]
- [9] Dong Z J, Yuan X H, Miao W M. A review of sex determination and differentiation and the research methods of fish [J]. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 2004, 24(6): 74 - 79. [董在杰, 袁新华, 缪为民. 鱼类的性别决定和分化及其研究方法综

- 述. 湛江海洋大学学报,2004,24(6):74-79.]
- [10] Chen F Y. Preliminary studies on the sex-determining mechanism of *Tilapia massambica* Peters and *T. hornorum* Trewavas [J]. Verh-Int Ver Theor Agnew Limnol,1969,17:719-724.
- [11] Zhang Y Y,Zan L S,Wang H B. Genome array on differentially expressed genes of muscle tissue in intact male and castrated Qinchuan cattle [J]. Hereditas,2010,32(11):1166-1174. [张莺莺, 咎林森, 王洪宝. 利用基因芯片技术筛选秦川牛公牛与阉牛肌肉组织差异表达基因. 遗传,2010,32(11):1166-1174.]
- [12] Luan D Q,Chang G B,Sheng Z W, et al. Analysis of gene expression profiles in Rugao chicken muscles during different periods [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica,2012(1):14-21. [栾德琴, 常国斌, 盛中伟, 等. 如皋鸡不同时期肌肉组织生长相关基因的表达谱分析. 畜牧兽医学报,2012,43(1):14-21.]
- [13] Li R L,Zhang Z Y,Wang D C, et al. Study on gene differential expression of muscle between *Paralichthys olivaceus* with different growth speed [J]. Journal of Shandong Agricultural University, 2007,38(1):7-10. [李荣岭, 张兆远, 王丹晨, 等. 不同生长速度牙鲆的肌肉组织基因差异表达研究. 山东农业大学学报:自然科学版,2007,38(1):7-10.]
- [14] Livak K J,Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2(-\Delta\Delta C(T))$  Method [J]. Methods, 2001,25(4):402-408.
- [15] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. Science, 1992, 257(5072):967-971.
- [16] Fei X L, Wang Y L. High throughput screening methods used to identify differentially regulated genes [J]. Chinese Journal of Cell Biology,2004,26(4):339-343. [李斐雪, 王雁玲. 差异表达基因的高通量筛选方法. 细胞生物学杂志,2004,26(4):339-343.]
- [17] Xu D Q,Xiong Y Z. Research progress of techniques for cloning differentially expressed gene [J]. Animal Science Abroad,2004,31(3):31-34. [徐德全, 熊远著. 差异表达基因克隆技术的研究进展. 中国畜牧兽医,2004,31(3):31-34.]
- [18] Xie W W,Wang P Q,Yang Q C, et al. Methods for plant differential expressed gene cloning and progress [J]. Journal of Chongqing University: Natural Science,2005,28(12):96-100. [谢伟伟, 王凭青, 杨青川, 等. 植物差异表达基因克隆技术及研究进展. 重庆大学学报:自然科学版,2005,28(12):96-100.]
- [19] Xiao C T, Chu M X, Fu Y. Recent progress of several screening methods for differentially expressed genes in animal development and reproduction [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2006,33(4):34-38. [肖朝庭, 储明星, 傅衍. 几种基因差异表达筛选技术在动物发育与繁殖中的最新进展. 中国畜牧兽医,2006,33(4):34-38.]
- [20] Tian W N,Zhang S F, Li X Z, et al. Screening, cloning and sequence analysis of the differential expression genes in Longissimus dorsi of Yanbian yellow cattle [J]. Hereditas,2011,33(11):1219-1224. [田万年, 张守发, 李香子, 等. 延边黄牛背最长肌差异表达基因的筛选、克隆及序列分析. 遗传,2011,33(11):1219-1244.]
- [21] Hwang K C,Lee H Y,Cui X S, et al. Identification of maternal mRNAs in porcine parthenotes at the 2-cell stage: A comparison with the blastocyst stage [J]. Molecular Reproduction and Development, 2005,70(3):314-323.
- [22] Wang L Y, Hong Q H, Zhang Y Z. Real-time quantitative PCR and its applications [J]. Chinese Journal of Cell Biology,2004,26(1):62-67. [王梁燕, 洪奇华, 张耀洲. 实时定量 PCR 技术及其在应用. 细胞生物学杂志,2004,26(1):62-66.]
- [23] Kasinsky H E,Lewis J D,Dacks J B, et al. Origin of H1 linker histones [J]. The FASEB Journal,2001,15(1):34-42.
- [24] Abraham M R,Selivanov V A,Hodgson D M, et al. Coupling of cell energetics with membrane metabolic sensing: Integrative signaling through creatine kinase phosphotransfer disrupted by M-CK gene knock-out [J]. The Journal of Biological Chemistry,2002,277(27):24427-24434.
- [25] Muhlebach S M,Gross M,Wirz T, et al. Sequence homology and structure predictions of the creatine kinase isoenzymes [J]. Molecular and Cellular Biochemistry,1994,133-134(1):245-262.
- [26] Sun H W,Liu C W,Hui C F, et al. The carp muscle-specific sub-isoenzymes of creatine kinase form distinct dimers under different temperatures [J]. The Biochemical Journal,2002,368(Pt3):799-808.
- [27] Zhang M,Zhao J L,Deng Y F. Cloning and tissue expression analysis of creatine kinase (m-ck) cDNA



- from the mandarin fish, *Siniperca chuatsi* [ J ]. Zoological Research, 2010, 31 ( 1 ): 77 - 83. [ 张敏, 赵金良, 邓燕飞. 鳊肌酸激酶 M-CK cDNA 的克隆与组织表达分析. 动物学研究, 2010, 31 ( 1 ): 77 - 83. ]
- [28] Yan Z H, Zheng D S. Calcium binding protein Parvalbumin ( parvalbumin ) and its distribution in the central nervous system [ J ]. Chinese Journal of Neuroanatomy, 1992, 8 ( 1 ): 17 - 22. [ 颜焱华, 郑德枢. 钙结合蛋白 parvalbumin ( 小白蛋白 ) 及其在中枢神经系统中的分布. 神经解剖学杂志, 1992, 8 ( 1 ): 17 - 22. ]
- [29] van de Wetering M, Oosterwegel M, van Norren K, et al. Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes [ J ]. The EMBO Journal, 1993, 12 ( 10 ): 3847 - 3854.
- [30] Cheung M, Abu-Elmagd M, Clevers H, et al. Roles of Sox4 in central nervous system development [ J ]. Brain Research. Molecular Brain Research, 2000, 79 ( 1 - 2 ): 180 - 191.
- [31] Schilham M W, Moerer P, Cumano A, et al. Sox-4 facilitates thymocyte differentiation [ J ]. European Journal of Immunology, 1997, 27 ( 5 ): 1292 - 1295.
- [32] Busslinger M. Transcriptional control of early B cell development [ J ]. Annual Review of Immunology, 2004, 22: 55 - 79.

## Screen of the differentially expressed genes in muscle tissue of the male and female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

WU Kui<sup>1,2</sup>, LIANG Hongwei<sup>2</sup>, LI Zhong<sup>2</sup>, WANG Dan<sup>2</sup>, WANG Chunzhi<sup>1,2</sup>, ZOU Guiwei<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China)

**Abstract:** Annealing control primer (ACP) system was applied to find candidate genes related to muscle growth of Nile tilapia by screening differentially expressed genes in the muscle tissues of male and female fish. This study randomly selected five male and five female fish from Nile tilapia populations cultured under the same conditions to build a RNA pool, and differentially expressed genes of two groups were analyzed by annealing control primer system. Eight differentially expressed genes were identified and sequenced by amplification with 20 arbitrary primers. In these genes, five were already known as *variant 3 (LOC100691543)*, *60S ribosomal protein L3 (RL3)*, *Parvalbumin beta-like*, *muscle-type creatine kinase M2-CK* and *transcription factor Sox4* gene, and others, while three were unknown. Base on quantitative real-time PCR, the relative expression levels of *transcription variant 3 (LOC100691543)* and *ACP6-Y* in the muscle of male Nile tilapia were significantly higher than those in female fish ( $P < 0.01$ ), while the relative expression levels of *ACP3-X*, *60S ribosomal protein L3 (RL3)*, *Parvalbumin beta-like*, *ACP15-X*, *muscle-type creatine kinase M2-CK* and *transcription factor Sox4* in the muscle of female Nile tilapia were significantly higher than those in male fish ( $P < 0.01$ ). All the 8 ESTs were screened by annealing control primer system, which may have participated in regulating muscle growth of male and female Nile tilapia. This study laid a foundation for further screening of muscle growth related genes.

**Key words:** *Oreochromis niloticus*; muscle tissue; differentially expressed genes; annealing control primer (ACP) system

**Corresponding author:** ZOU Guiwei. E-mail: zougw@yfi.ac.cn