

文章编号: 1000-0615(2005)04-0467-06

牙鲆变态早期 cDNA 文库的构建和 parvalbumin 基因的克隆

龚小玲¹, 鲍宝龙^{1,2}, 杨桂梅¹, 任大明²

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;

2. 复旦大学遗传学国家重点实验室, 上海 200433)

摘要: 在前期的研究中, 克隆到牙鲆变态早期和变态前差异表达的 parvalbumin 基因片断 cDNA。为了克隆 parvalbumin 基因的全长 cDNA, 构建了变态早期 (孵化后 23 d 仔鱼) 牙鲆头部的全长 cDNA 文库, 并对文库的滴度和插入片段大小进行了评估。同时采用锚定 PCR 法从 cDNA 文库筛选出 parvalbumin 基因的全长 cDNA。结果表明, 所构建的牙鲆变态早期头部 cDNA 文库的滴度为 1.2×10^6 PFU \cdot mL⁻¹, 插入片段的平均长度为 1 000 bp 左右。parvalbumin 基因的全长 cDNA 的长度为 603 bp, 编码 109 个氨基酸, 含有两个 EF 手型钙离子结合域: DQDGS GFIEEEL (52~64) 和 DSDGDGKIGVEEF (91~103), 以及一个 ATP/GTP 结合位点模序: ACGLAGKS (33~40), 是一种典型的钙离子结合蛋白。通过 parvalbumin 基因氨基酸序列的同源比较分析表明, 牙鲆 parvalbumin 基因是比较保守的蛋白, 与其它鱼类享有 61.5%~68.8% 序列同源。系统分析表明, 牙鲆的 parvalbumin 基因与狭鳕 (*Theragra chalcogramma*) 最为接近。

关键词: 牙鲆; 变态早期; 全长 cDNA 文库; 锚定 PCR; parvalbumin 基因; 钙离子结合蛋白

中图分类号: S917 文献标识码: A

Construction of cDNA library and analysis of parvalbumin gene sequence in metamorphosing flounder *Paralichthys olivaceus*

GONG Xiao-ling¹, BAO Bao-long^{1,2}, YANG Gui-mei¹, REN Da-ming²

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Institute of Genetics, Life Science School, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: A fragment cDNA of parvalbumin gene has been cloned, which expressed differently between pre-metamorphosis and pre-metamorphosis stages of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. For the requirement of further research on the role of parvalbumin in metamorphosis stage, it is necessary to clone the full-length cDNA of parvalbumin gene. Here we constructed a head tissue full-length cDNA library of pre-metamorphosing flounder (23 dph, day post hatch) using SMART™ technique. The titer of cDNA library was estimated as 1.2×10^6 PFU \cdot mL⁻¹, which was about 1000 times coverage of gene expression profile, and the inserted fragments in the library are about 1000 bp length. Through two runs anchor-PCR with target gene specific primers and λ Triplex2 primers, we obtained a full length cDNA of parvalbumin gene from the cDNA library. The full-length cDNA of parvalbumin gene consisted of 603 bp nucleotides, and encodes 109 amino acids with two EF-hand calcium-binding domains: DQDGS GFIEEEL (52~64) and DSDGDGKIGVEEF (91~103), and an ATP/GTP-binding site motif A (P-loop): ACGLAGKS (33~40). The structure of the sequence shows the parvalbumin is a typical calcium-binding protein. Further analysis with homologue sequence comparison shows the flounder parvalbumin is a conserved protein, which shares 61.5%~68.8% similarity with other teleosts, such as 61.5% with channel catfish *Ictalurus punctatus*, 68.8% with zebrafish *Danio rerio*. The phylogenetic analysis shows the closest relationship existed between parvalbumins of Japanese flounder and cod *Theragra chalcogramma*. Parvalbumin plays biological role of relaxation of muscle after contraction by soaking free calcium in cell. The recent researches show the parvalbumin gene expressed differentially in GABA

收稿日期: 2005-03-16

资助项目: 上海市教委发展基金项目 (科 2000-104); 上海水产大学校长基金项目 (2004-43); 上海市教委重点学科项目

作者简介: 龚小玲 (1972-), 女, 湖北蕲春人, 博士研究生, 主要从事鱼类学和鱼类系统发生学的研究。E-mail: xlgong@shfu.edu.cn

通讯作者: 鲍宝龙, Tel: 021-65710024, E-mail: blbao@shfu.edu.cn

neurons. However, it is unclear about the role of parvalbumin in metamorphosing flatfish, including Japanese flounder. The results reported here should be helpful for the future work such as gene expression location, gene function research.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; metamorphosis; full-length cDNA library; anchor-PCR; parvalbumin gene; calcium-binding protein

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)主要分布在中国、日本沿海,是目前国内非常重要的海水养殖鱼类。同其它鲽形目鱼类一样,牙鲆在早期发育阶段存在明显的变态现象^[1]。由于变态过程中的形态、生理方面都有剧烈的变化,在苗种的人工培育过程中造成较高的死亡率^[2]。变态过程中的眼睛移动以及人工苗种的白化现象都与变态有关^[3],所以关于牙鲆变态的研究越来越受到广泛的关注。

利用分子生物学手段研究基因在发育中的作用,在获得基因片段后,需要进一步得到全长 cDNA 序列(最起码要克隆到包含整个读码框序列),以推断氨基酸序列。目前克隆全长 cDNA 序列主要有两种方法,一是利用 RACE 方法克隆到全长 cDNA 的 5' 端和 3' 端,二是利用构建全长 cDNA 文库,通过筛选文库而获得全长序列。为了今后大量筛选牙鲆变态早期阶段表达的基因,我们选择了构建 cDNA 文库的策略。在前期的研究中,我们通过抑制差减杂交法筛选出了 parvalbumin 基因的片段 cDNA 序列。为了今后进一步研究 parvalbumin 基因在牙鲆变态中的作用,本文利用通过建立和筛选牙鲆变态早期头部的 cDNA 文库,克隆到全长 cDNA,并对其序列特征及其进化进行了相关的分析。

1 材料和方法

1.1 仔鱼饲养

孵化后 17 d 的牙鲆仔鱼购自中国水产科学院北戴河增殖中心,饲养在 80L 的塑料缸中,水温控制在 20 ± 0.5 °C,用刚孵化的卤虫无节幼体投喂,饵料密度维持在每毫升 5 个。牙鲆变态早期是指从眼睛开始移动到冠状幼鳍开始缩短^[4,5],本实验以孵化后 23 d 仔鱼为实验材料。

1.2 总 RNA 抽提

为了防止肠道内饵料生物基因的污染,只提取仔鱼头部的总 RNA。把 100 mg 的仔鱼头部与 1 mL 的 TrizolTM 试剂(Gibco BRL)移入冰上匀浆器中匀浆,匀浆液中加入 0.2 mL 氯仿,4 °C 下 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min; 在转移的液相中加入 0.5 mL 的异丙醇,室温下放置 10 min 后 4

°C $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 倒掉上清,用 75% 酒精洗涤后自然凉干,加入适量 0.1% DEPC 去离子水溶解,置于 -70 °C 保存。总 RNA 经过紫外分光光度计确定浓度和纯度。

1.3 mRNA 纯化

按照 mRNA 纯化试剂盒(Pharmacia 公司)说明书操作。把溶解在洗脱液中的 1 mg 总 RNA 加入洗脱柱, $350 \times g$ 离心 2 min; 然后在洗脱柱中加入 0.25 mL 高盐缓冲液, $350 \times g$ 离心 2 min; 重复上一步; 加 0.25 mL 低盐缓冲液, $350 \times g$ 离心 2 min; 重复上一步骤 2 次; 加 0.25 mL 65 度的洗脱液, $350 \times g$ 离心 2 min; 重复以上步骤 3 次; 收集所有洗脱下来的 mRNA。经紫外分光光度计确定 mRNA 浓度和纯度。

1.4 cDNA 文库的构建

取 1 μg mRNA 用 SMART IV Oligonucleotide 和 CDS III/3' PCR Primer 合成第一条链。再用 5' PCR Primer 和 CDS III/3' PCR Primer 通过引物延伸合成双链 DNA。然后经过蛋白酶 K 消化, *Sfi* I 酶切,过柱分离并收集大于 500 bp 的双链 cDNA,与载体 λ TripIEx2 的左右臂在 16 度下连接过夜。然后按照 Epicentre 公司的 MaxPlaxTM λ 包装抽提物产品说明书进行噬菌体包装反应。

1.5 文库的扩增及质量的检测

用常规方法检测文库的滴度^[6]。将包装得到的 cDNA 文库按 1:10, 1:100 和 1:1000 进行稀释,然后各取 1 μL 与 200 μL 已用 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgSO_4 重悬的过夜培养的 XL1-Blue 混合, 37 °C 吸附 15 min。再与 4 mL 上层琼脂快速混匀,倒在 LB 平板上 37 °C 培养 8~16 h, 计数噬菌斑确定 cDNA 文库的滴度。根据初始文库的滴度,安排琼脂平板扩增文库,计算扩增文库的滴度并在 -70 °C 下保存。

取一部分保存的文库,通过纯化噬菌体和抽提噬菌体 DNA 后,用 λ TripIEX2 插入子筛选引物(λ Trip-1 Primer 和 λ Trip-2 Primer)通过 PCR 确定 cDNA 文库插入片段的平均大小。PCR 反应体系(25 μL): 1 μL 文库 DNA, 各 1 μL 引物, 1 μL dNTP, 2.5 μL PCR buffer, 1 μL *Taq*。PCR 反应条

件: 95 °C 5 min, 35 个循环: 95 °C 30 s, 68 °C 4 min, 然后 68 °C 再延伸 8 min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖电泳检测(表 1)。

表 1 本实验所用引物的名称和序列

Tab. 1 The primer and its sequence used in this research

引物 primers	序列 sequences (5' to 3')	作用 utilization
SMART IV Oligonucleotide	AAGCAGTGGTATCAA CGCAGAGTGGCCATTA CGG CCGG G	文库构建 construction of library
CDS III/3 PCR Primer	ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG- d(T) ₃₀ N ₋₁ N	文库构建 construction of library
5' PCR Primer	AAGCACTGGTA TCAACGCAGAGT	文库构建 construction of library
λTrip- 1 Primer	CTCGG GAAGCGGCCATTGTGTTGGT	载体 5' 引物 5' PCR primer
λTrip- 2 Primer	ATA GCACTCACTA TAGGG CGAATTGGCC	载体 3' 引物 3' PCR primer
PVB- A Primer	TTGTCAGTGAGTGTCTGGCACCAG	PVB 特异性引物 specific PVB primer
PVB- B Primer	AGCGTGGTCGCGGCGAGGTGCCTTGG	PVB 特异性引物 specific PVB primer

1.6 锚定 PCR 法筛选 cDNA 文库

通过两次 PCR 从 cDNA 文库中筛选 parvalbumin 全长 cDNA 的策略见图 1。

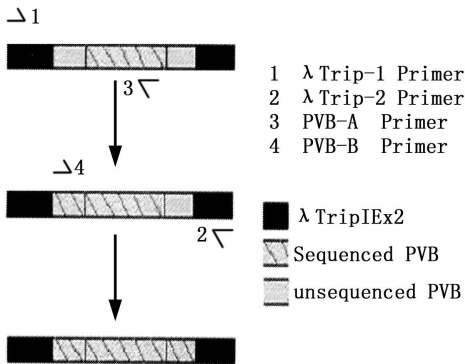


图 1 利用锚定 PCR 筛选 cDNA 文库的策略

Fig. 1 The procedure of anchor-PCR screening cDNA library

根据从抑制差减文库中筛选得到的 parvalbumin 基因片段序列设计特异性引物(PVB-A Primer), 与文库载体 λTripIEx2 5' 端引物 λTrip- 1 Primer 进行第一轮 PCR, 扩增含有 5' 端序列的 parvalbumin 基因。25 μL PCR 体系中: 1 μL cDNA 文库, 各 1 μL 的引物, 2.5 μL 10× PCR buffer, 1 μL dNTP, 0.5 μL Taq. PCR 反应条件: 95 °C 5 min, 35 个循环: 95 °C 30 s, 68 °C 4 min, 然后 68 °C 延伸 8 min。PCR 产物在 1.0% 琼脂糖电泳检测。PCR 产物经过小量胶回收试剂盒(华舜公司)回收, 经 T/A 克隆, 测序后, 以 parvalbumin 基因 5' 端的序列设计特异性引物(PVB- B Primer), 与文库载体 λTripIEx2 3' 端引物 Trip- 2 Primer 进行第二轮 PCR(PCR 反应体系与反应条件与第一

轮相同), 扩增出 parvalbumin 全长的 cDNA。PCR 产物经过小量胶回收试剂盒回收, 经 T/A 克隆, 测序。

1.7 序列分析

先用 BLAST 搜索 GenBank, 确定该序列的基因名称。用 DNASTAR 软件包进行读码框预测, 得到氨基酸序列, 然后利用 CLUSTAL W 软件对各种生物的 parvalbumin 氨基酸序列进行同源比较分析。通过搜索 PROSITE 蛋白质数据库 (<http://www.expasy.org/prosite/>) 进行功能域分析。分子进化分析采用 PAUP 软件包中的邻接法 (neighbor-joining method) 构建进化树, 构建的进化树的可靠性通过 1000 个 bootstrapping 重复进行评估。在进化树构建中, 采用人类的另一个钙离子结合蛋白 oncomodulin 蛋白 (OCM) 作为外来群。

2 结果

2.1 cDNA 文库的构建、扩增及质量检测

孵化后 23 d 的牙鲈仔鱼 cDNA 初始文库的滴度为 1.2×10^6 PFU · mL⁻¹, 文库扩增后的滴度为 2.6×10^{10} PFU · mL⁻¹, 符合 cDNA 文库构建的要求。图 2 显示的孵化后 23 d 牙鲈仔鱼的 cDNA 文库插入片段在几百到几千 kb 之间, 但主要分布在 1.0 kb 左右, 表明此文库有足够长度的插入片段。

2.2 parvalbumin 全长 cDNA 序列和同源分析

利用锚定 PCR 法筛选 cDNA 文库成功克隆出长度为 603 bp 的 parvalbumin 基因的全长 cDNA (accession number: AY953372), 读码框从 63 到 392, 编码 109 个氨基酸, 没有信号肽序列。通过搜索 PROSITE 蛋白质数据库, 与其他物种的 parvalbumin 蛋白一样, 牙鲈 parvalbumin 蛋白包含

两个 EF 手型钙离子结合域(EF-hand calcium-binding domain): DQDGSGFIEEEEL (52~64) 和 DSDGDGKIGVEEF(91~103), 以及一个 ATP/GTP 结合位点模序(ATP/GTP-binding site motif A (P-loop)): ACGLAGKS(33~40) (图3)。

通过对氨基酸序列的同源比较分析, 发现牙鲈 parvalbumin 和斑马鱼 (*Danio rerio*), 狭鳕 (*Theragra chalcogramma*), 鲤 (*Cyprinus carpio*), 日本鲭 (*Scomber japonicus*), 尖吻鲈 (*Lates calcarifer*), 花氏溪 (*Rivulus marmoratus*), 斑点叉尾 (*Ictalurus punctatus*), 非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*), 大鼠 (*Rattus norvegicus*), 小鼠 (*Mus musculus*), 人类 (*Homo sapiens*), 分别有 68.8%, 67.9%, 66.0%, 65.7%, 65.1%, 64.2%, 61.5%, 63.3%, 50.5%, 50.5%, 48.6% 的序列同源性。两个 EF 手型钙离子结合域和 ATP/GTP 结合位点模序的序列相对其它区域更加保守(图4)。

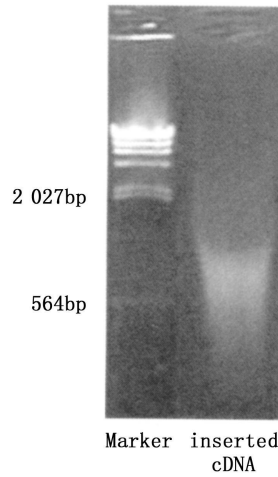


图2 cDNA 文库插入片断长度的检测

Fig.2 The length of inserted cDNA in cDNA library
Marker. λ HindIII digest

```

agcgtggtcgcgcgagaggtgccttggttttactcgctcaacgcagctcaaagaataaa 60
aaATGTCTCTTGGCCACCAAGCTCGATGCAGGTCAGGTGAAAGCCGCTCTGGACGGCTGCG 120
  M S L A T K L D A G Q V K A A L D G C A 20
CAGCTGTGTGATTCCCTTCAATTACAAGAATTTCTTCGCCGCTGTGGCCTGGCCGGCAAGA 180
  A A D S F N Y K N F F A A C G L A G K S 40
GCGCCGATGAAGTCAAGGTAGCCTTCGGCGTCATTGACCAAGGACGGCAGTGGCTTCATTG 240
  A D E V K V A F G V I D Q D G S G F I E 60
AGGAGGAAGAGCTGAAGCTGTTCCTGCAGAACTTCTCTGCTGGTGCAGAGCACTCACTG 300
E E E L K L F L Q N F S A G A R A L T D 80
ACAAGGAGACCAAGGAATTCCTCGCGCTGGTGACAGTGATGGTATGGCAAGATCGGAG 360
  K E T K E F L A A G D S D G D G K I G V 100
TCGAGGAGTTTGCTGCGCTTGTAAGGCAtaaatgtccattgaccaagatcaaccacttt 420
E E F A A L V K A * 109
tcacggaactgcgaactccttgcaagattcagtaatcatcagctgaaagaatatttttta 480
tatcttatttatgagttgctgcggaatatttctcaacatggaacacatattttactggt 540
aatgttattcaagtgtgttatatgttctgaaaaatgactttgtgcaaaactgtaaaaaaaa 600
aaa 603
  
```

图3 parvalbumin 全长 cDNA 序列和预测氨基酸序列

Fig.3 The cDNA and deduced amino acid sequence of parvalbumin gene

阴影显示的是两个 EF 手型钙离子结合域, 方框显示的是 ATP/GTP 结合位点模序

the shades are two EF-hand calcium-binding domains, the box is ATP/GTP-binding site motif A (P-loop)

牙鲆 <i>P. olivaceus</i>	MSLATKLDAGQVKAALDGCAAADSFNYKNFFA[ACGLAGKS]ADEVKVAFGVIDQDQSGFIE 60
狭鳕 <i>T. chalcogramma</i>	MSFAGVLDADVKAALGACAAADSFNYKTFK[ACGLAASKS]HEEVKKAFFVIDQDQSGFIE 60
斑点叉尾鲷 <i>I. punctatus</i>	MAFAGVLDNADITAAALDACKADGSFNHKSFFT[KVGLTGKS]ADDVKKAFAIIDQDKSGFIE 60
尖吻鲈 <i>L. calcarifer</i>	MAFAGILNEADITAAALAACQAADSFKHKDFV[KVGLAGKS]DDDVKKAFAVIDQDKSGFIE 60
日本鲭 <i>S. japonicus</i>	MAFASVLDKDAEVTAALDGCKAAGSFHKKFFK[ACGLSGKS]TDEVKKAFAIIDQDKSGFIE 60
花氏溪鱧 <i>R. marmoratus</i>	MAFAGVLDNADITKALDECKGADSFYKFFK[TCGLAGKS]ADDVKKAFAIIDQDKSGFIE 60
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	MAFAGILKDEDVAAALKDCAAADSFNYKNFFA[KVGLSAKS]PDDIKKAFVVIDQDKSGFIE 60
鲤 <i>C. carpio</i>	MAFAGILNDADITAAALQGCQAADSFYKSFFA[KVGLSAKT]PDDIKKAFVVIDQDKSGFIE 60
非洲爪蟾 <i>X. laevis</i>	MAFGGILSEADISAAALQNCQAADSFNFKTFFA[QSGLSSKS]ADDVKNVFAILDQDRSGFIE 60
小鼠 <i>M. musculus</i>	MSMTDVLSAEDIKKAIGAFAAADSFHKKFFQ[MVGLKKKN]PDEVKKVFHILDKDKSGFIE 60
大鼠 <i>R. norvegicus</i>	MSMTDLLSAEDIKKAIGAFATAADSFHKKFFQ[MVGLKKKS]ADDVKKVFHILDKDKSGFIE 60
人类 <i>H. sapiens</i>	MSMTDLLNAEDIKKAIGAFSATDSFHKKFFQ[MVGLKKKS]ADDVKKVFHMLDKDKSGFIE 60
牙鲆 <i>P. olivaceus</i>	EDELKFLQNFASAGARALTDKETKEFLAAGSDGDGKIGVEEFAALVKA- 109
狭鳕 <i>T. chalcogramma</i>	EDELKFLQTFGAGARELTAETKAFLLAAGDEDGDMIGVDEFVTLVKA- 109
斑点叉尾鲷 <i>I. punctatus</i>	EDELKFLQNFKSSARALTDKETKFLKAGDTDGDGKIGVDEFASLVKA- 109
尖吻鲈 <i>L. calcarifer</i>	EDELKFLQNFASARALTDKETKFLKAGSDGDGKIGVDEFASLVKV- 109
日本鲭 <i>S. japonicus</i>	EDELKFLQNFKAGARALSDAETKAFLLKAGSDGDGKIGIDEFAAMIKG- 109
花氏溪鱧 <i>R. marmoratus</i>	EDELKFLQNFSSGAGARALTDKETKAFLLKAGSDGDGKIGADEFAVMVKA- 109
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	EDELKFLQNFASAGARALTDKETKAFLLSAGSDGDGKIGVDEFALLVKA- 109
鲤 <i>C. carpio</i>	EDELKFLQNFASAGARALTDKETKAFLLKAGSDGDGKIGVDEFASLVKA- 109
非洲爪蟾 <i>X. laevis</i>	EDELKFLQNFSSASARALTDKETKAFLLAAGSDGDGKIGVEEFSLVKP- 109
小鼠 <i>M. musculus</i>	EDELGSILKGFSSDARDLSAKETKTLAAGDKDGDGKIGVEEFSSTLVAES 110
大鼠 <i>R. norvegicus</i>	EDELGSILKGFSSDARDLSAKETKTLMAAGDKDGDGKIGVEEFSSTLVAES 110
人类 <i>H. sapiens</i>	EDELGSILKGFSPDARDLSAKETKMLMAAGDKDGDGKIGVDEFSTLVAES 110

图 4 parvalbumin 氨基酸序列的同源比较

Fig. 4 Homologue comparison with parvalbumin amino acid sequences

阴影显示的是两个 EF 手型钙离子结合域, 方框显示的是 ATP/GTP 结合位点模序

the shades are two EF-hand calcium-binding domains, the box is ATP/GTP-binding site motif A (P-loop)

2.3 parvalbumin 的进化分析

系统树分析表明牙鲆 parvalbumin 和真骨鱼类及两栖类聚在一起(可能性达到 99%), 而哺乳类单独聚在一起(可能性达到 100%), 说明低等脊椎动物和哺乳类的物种分化以后, 才出现 parvalbumin 的进化。牙鲆 parvalbumin 和鳕形目的狭鳕最为接近, 而并不是鲈形目的尖吻鲈和日本鲭(图 5)。

3 讨论

目前构建 cDNA 文库的主要目的是从中克隆全长的 cDNA, 所以高质量的 cDNA 文库主要标志是要包含全长的 cDNA。目前 cDNA 文库构建的方法比较多, 但仍不能解决的问题是文库中插入的片段并不能保证是全长的 cDNA, 尤其是 5' 端的部分缺失是不可避免的, 因为, 目前在 5' 端加接头的过程并没有特异的识别, 降解的或没有降解的 RNA 都会被加上接头。所以, 尽可能的防止

RNA 降解是构建高质量 cDNA 的关键^[6]。本研究中的总 RNA 具有很高的完整性, 使构建高质量的 cDNA 文库成为可能, 同时本 cDNA 文库具有较长的插入片段也反证了总 RNA 无明显降解。

具有完整的 RNA 不能保证有完整的 5' 端, 因为当用 Oligo(dT) 作为引物引导较长 mRNA 的逆转录, 或 mRNA 的二级结构较多时, 逆转录酶会提前终止逆转录。在使用自身引导法或置换合成法合成第二条链时, 对应于 mRNA 5' 端的信息会丢失^[6]。这使得我们无法获得全长的 cDNA。本研究中的 SMART 技术利用 SMART III Oligo 在逆转录中作为 mRNA 5' 端延伸出的模板合成对应的一段序列, 再用 5' PCR Primer 和 CDS III/3' PCR Primer 进行引物延伸, 就能合成完整的双链 cDNA。

本 cDNA 文库 10^6 PFU·mL⁻¹ 的滴度在大多数情况下能够代表牙鲆变态早期的表达的 mRNA。因为根据人类基因组公布的数据, 目前

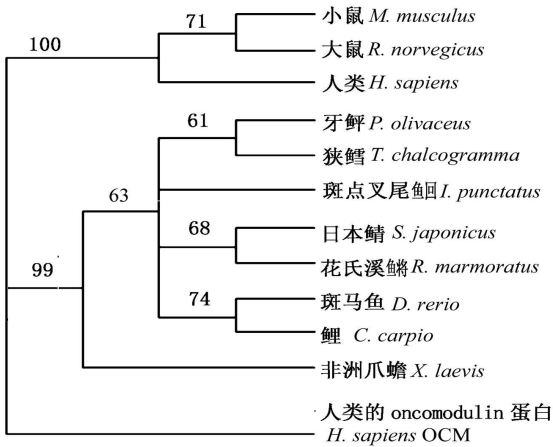


图5 parvalbumin 氨基酸的进化分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of parvalbumin

以人类的 oncomodulin 蛋白 (OCM) (NM_006188) 为外来群, 利用 neighbor-joining method 构建的系统树, 同时利用 bootstrap 对系统树进行了评估。图中所采用的 parvalbumin 序列同图 4

Hylogenetic tree was drawn by the neighbor-joining method as outgroup of Homo sapiens oncomodulin (OCM) (NM_006188), and evaluated by bootstrap. other sequences showed as in Fig 4

估计人类基因的数目也只有 2~ 2.5 万个^[7], 如果以基因总数的 10% 基因表达, 本 cDNA 文库大约有近 1000 倍的冗余。从 cDNA 文库中筛选全长 cDNA 的主要方法是通过探针杂交, 但此过程比较烦琐, 易受假阳性的干扰^[6]。本研究通过以锚定 PCR 法来筛选全长 cDNA, 能够大大降低筛选的强度。

虽然本文从此全长 cDNA 文库中筛选的全长 parvalbumin 基因本身只有 603 bp, 其他生物的全长 parvalbumin 基因也在 600 bp 左右。我们从此文库中也成功筛选出全长 1291 bp 的基因 Sfrs3。通过氨基酸序列的同源比较和系统发育的进化分析, 进一步表明本研究从 cDNA 文库中筛选出的是 parvalbumin 基因。parvalbumin 是非常重要的钙离子结合蛋白, 早期的研究表明其主要与肌肉的放松有关^[8], 在 parvalbumin 基因敲除的小鼠中, 肌肉不易出现疲劳^[9]。在中枢神经系统中, parvalbumin 主要存在于电生理和代谢生理更为活跃的 GABA 敏感的神经元中。另外, parvalbumin 蛋白可能还有翻译调节的功能, 因为它能和核苷酸形成复杂的蛋白质-核酸结合体^[10]。近年的研究表明, 在患有精神分裂症病人的 GABA 敏感

的神经元中, parvalbumin mRNA 表达水平明显降低, 在患有帕金森病病人的多巴胺敏感的神经元中, parvalbumin mRNA 表达水平明显增加, 表明 parvalbumin 和中枢神经的生理密切相关^[11, 12]。在本研究中, parvalbumin 基因在早期发育过程中的牙鲆头部组织中表达, 但其表达的具体组织并不清楚。在今后的研究中, 我们将采用整体原位杂交技术来确定 parvalbumin 基因在牙鲆变态过程中的组织定位, 进一步研究 parvalbumin 基因在变态中的作用。

衷心感谢复旦大学遗传学国家重点实验室陈丽珊、吕韵哲和魏东旺博士等的无私帮助。

参考文献:

- [1] 张孝威, 何桂芬, 沙学绅. 牙鲆和条鲷卵子及仔、稚鱼的形态观察[J]. 海洋与湖沼, 1965, 7(2): 159-180.
- [2] 鲍宝龙, 苏锦祥, 殷名称. 延迟投饵对真鲷、牙鲆仔鱼早期阶段摄食、存活及生长的影响[J]. 水产学报, 1998, 22(1): 33-38.
- [3] Seikal T, Watanabe T, Shimozak M. Influence of three geographically different strains of *Artemia nauplii* on occurrence of albinism in hatchery-reared flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1987, 53: 195-200.
- [4] Miwa S, Inui Y. Histological changes in the pituitary-thyroid axis during spontaneous and artificially-induced metamorphosis of larvae of the flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Cell Tissue Res, 1987, 249: 117-123.
- [5] Miwa S, Tagawa M, Inui Y. Thyroxine surge in metamorphosing flounder larvae [J]. Gen Comp Endocrinol, 1988, 70: 158-163.
- [6] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [7] Stein L. Human genome: end of the beginning [J]. Nature, 2004, 431: 915-916.
- [8] Munterner M, Kaser L, Weber J, et al. Increase of skeletal muscle relaxation speed by direct injection of parvalbumin cDNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 6504-6508.
- [9] Chen G P, Carroll S, Racay P, et al. Deficiency in parvalbumin increases fatigue resistance in fast-twitch muscle and upregulates mitochondria [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 281: 114-122.
- [10] Bastianelli E. Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum [J]. Cerebellum, 2003, (2): 242-262.
- [11] Soos J, Engelhardt J I, Siklos L. The expression of PARP, NF-kappa B and parvalbumin is increased in Parkinson disease [J]. Neuroreport, 2004, 15(11): 1715-1718.
- [12] Hashimoto T, Volk D W, Eggen S M, et al. Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia [J]. J Neurosci, 2003, 23(15): 6315-6326.