

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00967

## 斑马鱼 *rnf141* 基因结构与表达分析

李亚<sup>1</sup>, 王伦安<sup>2\*</sup>, 王玉明<sup>1</sup>, 杨平<sup>1</sup>, 潘克俭<sup>1</sup>, 黄明孔<sup>3</sup>

1. 成都医学院生物化学与分子生物学教研室, 成都 610081

2. 成都医学院科研中心, 成都 610081

3. 四川生殖卫生学院附属医院泌尿科, 成都 610041

**[摘要]** 目的: 探讨斑马鱼 *rnf141* 基因在物种间进化以及在斑马鱼胚胎发育和成体中表达分布特点。方法: 采用生物信息学方法分析斑马鱼 *rnf141* 基因结构特征; 运用胚胎整体原位杂交和多组织 RT-PCR 技术分别检测斑马鱼胚胎发育不同阶段和成体各组织 *rnf141* 基因表达情况。结果: 斑马鱼 RNF141 蛋白与人类和小鼠同源蛋白 (ZNF230、Znf230) 分别具有 79.8%、78.5% 的同源性, 其中 C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> 型锌指结构域及其保守的半胱氨酸和组氨酸残基组成与人类(或小鼠)的同源性分别为 84.8%、100%; 而且, 斑马鱼 RNF141 蛋白与人类 ZNF230 蛋白在 C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> 型锌指区域具有完全相同的二级结构。杂交结果显示, *rnf141* 基因在斑马鱼胚胎中广泛表达, 尤以端脑、小脑和后脑表达丰度为高。RT-PCR 结果表明, *rnf141* 基因在受检的成体组织中均有表达, 但在睾丸组织中表达丰度较高。结论: 斑马鱼 *rnf141* 基因为脊椎动物保守基因, 并可能在胚胎发育和精子发生过程中起着重要作用。

**[关键词]** 斑马鱼; *rnf141* 基因; 整体原位杂交

**[中图分类号]** Q 953

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2008)08-0967-04

### Expression and molecular characterization of zebrafish *rnf141* gene

LI Ya<sup>1</sup>, WANG Lun-an<sup>2\*</sup>, WANG Yu-ming<sup>1</sup>, YANG Ping<sup>1</sup>, PAN Ke-jian<sup>1</sup>, HUANG Ming-kong<sup>3</sup>

1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chengdu Medical College, Chengdu 610081

2. Center of Scientific Research, Chengdu Medical College, Chengdu 610081

3. Department of Urology, Affiliated Hospital of Reproduction Health College of Sichuan Province, Chengdu 610041

**[ABSTRACT]** **Objective:** To explore the molecular evolution of zebrafish *rnf141* gene and its expression in the embryo and adult zebrafish. **Methods:** The molecular characteristics of zebrafish *rnf141* gene were analyzed through a bioinformatics approach. Expression of *rnf141* gene in the embryos of different developmental stages and tissues of adult fish were examined by whole-mount *in situ* hybridization and multiple-tissue RT-PCR technique. **Results:** We noticed that zebrafish RNF141 protein shared a 79.8% and 78.5% homologies to its homologues in human and mouse (ZNF230, Znf230), respectively, especially that the C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>-type domain and the same conserved cysteine and histidine residues shared a 84.8% and 100% homologies to its homologues in human or mouse. Moreover, the secondary structure of C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>-type domain in zebrafish RNF141 protein was the same as that in its human homologue. Whole-mount *in situ* hybridization showed that zebrafish *rnf141* gene expressed ubiquitously during embryogenesis, with higher expression found in the telencephalon, cerebellum and hindbrain. RT-PCR revealed *rnf141* gene expression in all the adult tissues detected, and abundance was observed in the testicular tissue. **Conclusion:** These data suggest that zebrafish *rnf141* gene is conservative in the vertebrate and might play important roles in embryogenesis and spermatogenesis.

**[KEY WORDS]** zebrafish; *rnf141*; whole-mount *in situ* hybridization

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(8): 967-970]

作为一种新型的脊椎模式生物, 斑马鱼具有繁殖力强、生长快、胚胎透明以及与脊椎动物相近的基因结构和调节模式等诸多优点, 已成为人们研究人

类发育、系统功能、疾病发生等的重要工具<sup>[1]</sup>。ZNF230 基因是利用 mRNA 差异显示方法克隆获得的人类锌指蛋白基因, 并可能在精子发生中发挥

**[收稿日期]** 2008-01-28

**[接受日期]** 2008-05-25

**[作者简介]** 李亚, 硕士, 副教授. E-mail: liyalhj@tom.com

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 028-89947178, E-mail: wla@sohu.com

着重要作用<sup>[2-3]</sup>。尽管 ZNF230 同源基因——斑马鱼 *rnf141* 的全长 cDNA 序列已获克隆,但对于其在斑马鱼中的表达情况尚缺乏了解。为此,我们在本研究中初步探讨了斑马鱼 *rnf141* 基因的结构和时空表达特征,旨在为深入研究 ZNF230 基因在人类精子发生过程中的作用奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 材料 实验用斑马鱼来自中国科学院水生生物研究所;M-MLV 逆转录酶购自 Invitrogen;地高辛标记试剂盒购于 Roche; *Taq* DNA 聚合酶、SP6 和 T7 RNA 聚合酶、*Nco* I 和 *Sal* I 限制性内切酶、pGEM-T 载体和 TRIzol 均为 MBI 产品;PCR 引物合成和 DNA 测序均由上海生工生物工程技术服务有限公司完成;其他试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

1.2.1 斑马鱼 *rnf141* cDNA 序列分析 从 GenBank(登录号:BC071534)获取斑马鱼 *rnf141* 基因全长 cDNA 序列,使用开放阅读框(open reading frame,ORF)查询器(finder)预测其编码框;RNF141 蛋白在不同物种间的序列比对采用 Megalign 程序(DNASTAR 软件包)进行;RNF141 蛋白二级结构预测在 Prof 程序上进行。

1.2.2 反义 RNA 探针的制备 (1)探针序列的获得:首先,按照 TRIzol 试剂盒推荐条件提取斑马鱼组织总 RNA。其次,采用 RT-PCR 方法扩增包含大部分编码区及部分 3' 端非翻译区的 *rnf141* 基因 cDNA 序列(扩增片段长度为 789 bp)。引物序列(正向:5'-AAG CTT TGA TGA GTT CTT GGG TCG-3',反向:5'-GGA TCC TAC AGC AGC AGT CGT CCT-3')。反应体系:总体积 30  $\mu$ l,包括 1  $\times$  PCR buffer,4  $\mu$ l cDNA 模板,1 U *Taq* DNA 聚合酶,1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,0.1 mmol/L dNTPs,0.4  $\mu$ mol/L 引物。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。然后,将 PCR 产物克隆于 pGEM-T 载体中,重组质粒用 *Nco* I 和 *Sal* I 限制性内切酶线性化,测序鉴定。(2)探针制备与标记:重组质粒分别经 T7 和 SP6 RNA 聚合酶体外转录后获得正义和反义 RNA 探针,并用地高辛标记试剂盒加以标记。

1.2.3 胚胎整体原位杂交 分别选取受精 24、36 h 的斑马鱼胚胎,经固定液(4%多聚甲醛,0.1 mol/L NaCl,pH 7.4)于 4 $^{\circ}$ C 下处理 12 h,并置于 -20 $^{\circ}$ C 甲醛中备用。原位杂交参照相关手册<sup>[4]</sup>,并稍加修改

进行。杂交完成并经染色处理后,用 0.1 mol/L NaCl 溶液(pH 7.4)冲洗;不同浓度乙醇于室温下脱水,每次 3~5 min。中性树脂封片,荧光显微镜检并成像。

1.2.4 RT-PCR 取成体斑马鱼心脏、骨骼肌、大脑、胰腺、睾丸和卵巢组织,参照 TRIzol 试剂盒说明书分别提取总 RNA。采用与 1.2.2 相同的方法及反应条件扩增 *rnf141* cDNA 序列,RT-PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳后,在凝胶成像系统下观察 *rnf141* 基因的表达情况。同时,扩增上述 6 种组织中组成型表达基因  $\beta$ -actin,并以此作为阳性对照。

## 2 结果

2.1 斑马鱼 *rnf141* 全长 cDNA 序列特征分析 检索 GenBank 数据库获得斑马鱼 *rnf141* 基因全长 cDNA 序列(1 699 bp),经 ORF 查询器预测后的结果表明,*rnf141* 基因编码框全长 669 bp,位于 cDNA 88~756 bp 的位置,长度较人类 ZNF230 及小鼠 *Znf230* 基因编码框序列稍短<sup>[2,7]</sup>;编码框含有起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA,为一个完整的开放读码框,编码一个由 222 个氨基酸组成的多肽链。另外,多聚腺苷酸(polyA)信号序列(AATA-AA)位于 polyA 尾上游 19 bp 的位置(图 1)。

一级结构分析发现,RNF141 蛋白 C 端 146~183 氨基酸含有一个 C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> 型锌指结构域(图 1)。氨基酸序列比对显示,斑马鱼 RNF141 蛋白与人类、小鼠(或大鼠)同源蛋白的同源性分别为 79.8%、78.5%。其中,C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> 型锌指结构域及其保守的半胱氨酸和组氨酸残基组成与人类(小鼠、大鼠)的同源性分别达 84.8%、100%(图 2)。

Prof 软件预测结果显示,RNF141 蛋白二级结构中  $\alpha$ -螺旋占 22.5%、 $\beta$ -折叠占 12.2%;而人类 ZNF230 蛋白  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠的含量则分别为 32.2%、13.5%。但在高度保守的 C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> 型锌指结构域,上述两种蛋白的二级结构却完全一致(图略)。

2.2 斑马鱼胚胎整体原位杂交分析 用反义 RNA 探针分别与受精 24 h 和 36 h 后的斑马鱼胚胎杂交,结果表明,在两种不同发育阶段的胚胎中均检测到 *rnf141* mRNA,但端脑、小脑和后脑中 *rnf141* mRNA 杂交信号较胚胎其他部位更强(图 3)。

2.3 RT-PCR 分析 为研究 *rnf141* 基因在成体组织中的功能,我们采用 RT-PCR 技术分析了 *rnf141* 基因在成体斑马鱼多个器官组织中的表达。结果可见,在受检的 6 种器官组织中均检测到 789 bp 的特异性 *rnf141* cDNA 扩增片段,但以在睾丸组织中的

扩增条带信号最强(图 4)。

图 1 斑马鱼 *rnf141* 基因 cDNA 序列

Fig 1 cDNA sequence of zebrafish *rnf141* gene

Coding sequence is shown together with the translated amino acid sequence. The C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>-type domain is boxed and the conserved cysteine and histidine residues are highlighted in bold. Polyadenylation signal is in bold and underlined. Stop codon is indicated by an asterisk (\*). The primers for RT-PCR amplification are underlined with arrows

图 2 斑马鱼 RNF14 蛋白与人类 ZNF230 和 小鼠 Znf230 蛋白序列比对

Fig 2 Sequence comparison of zebrafish RNF141 with those of human and mouse

The conserved amino acid sequences are boxed. The predicated C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> ring finger domains are shaded and the conserved cysteines and histidines are marked with triangle(△)

图 3 *rnf141* 基因在斑马鱼胚胎中的 整体原位杂交表达谱

Fig 3 Expression of zebrafish *rnf141* gene in embryos by whole mount *in situ* hybridization

A: *Rnf141* anti-sense probe at 24 h after fertilization. B: *Rnf141* anti-sense probe at 36 h after fertilization. C: *Rnf141* sense probe at 24 h after fertilization(negative control). D: *Rnf141* sense probe at 36 h after fertilization(negative control)

图 4 斑马鱼组织 *rnf141* 基因 表达情况的 RT-PCR 分析

Fig 4 Expression of *rnf141* gene in selected zebrafish tissues by RT-PCR analysis

A: Results of human multiple tissue RT-PCR. 1: Heart; 2: Skeleton muscle; 3: Brain; 4: Intestines; 5: Testis; 6: Ovary; 7: Positive control; B: Amplifications of  $\beta$ -actin transcripts served as controls

### 3 讨 论

锌指蛋白是普遍存在于真核生物中的一类 DNA 结合蛋白,广泛地参与 DNA 识别、转录激活、细胞凋亡调控等生物过程<sup>[5]</sup>。与人类 ZNF230 蛋白一样,斑马鱼 RNF141 也属 C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>型锌指蛋白。该类蛋白的锌指基序结合 2 个锌离子,通常由 40~60 氨基酸残基组成,可用通式 CX<sub>2</sub>CX<sub>9-39</sub>-CX<sub>1-3</sub>HX<sub>2-3</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>4-48</sub>CX<sub>2</sub>C(C:半胱氨酸,X:任意氨基酸,H:组氨酸)表示。已有的研究表明,C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>型锌指蛋白主要为一些核内转录因子<sup>[6]</sup>,提示 *rnf141* 基因可能作为转录因子在斑马鱼体内发挥作用。

研究<sup>[2-3]</sup>发现,人类 ZNF230 基因含有 2 种大小分别为 1 kb、4.4 kb 的转录本。其中,与斑马鱼 *rnf141* 基因高度同源的 1 kb mRNA(编码 230 个氨

基酸残基的蛋白质,图2)仅存在于正常生育男性睾丸中,而在人类胚胎和某些原发性无精症患者睾丸中却检测不到该转录本;相反,4.4 kb mRNA则出现在睾丸以外的某些其他组织中;另外,小鼠 *Znf230* 基因也有类似的表达特点<sup>[7]</sup>;提示上述1 kb 转录物可能为人类精子发生过程中所特有。

本研究中,我们首先对 *rnf141* 基因的结构特征进行了分析。氨基酸序列同源性比较结果表明,斑马鱼 RNF141 蛋白与人类 ZNF230 及小鼠 *Znf230* 蛋白的同源性分别高达 79.8%、78.5%。其中,在关键的 C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> 型锌指结构域及其保守的半胱氨酸和组氨酸氨基酸组成的同源性更高,与人类 ZNF230 蛋白(或小鼠 *Znf230* 蛋白)相比,它们的相似性分别为 84.8%、100%。此外,二级结构预测结果显示,尽管斑马鱼 RNF141 蛋白和人类 ZNF23 蛋白在二级结构上存在较大的差异,但在 C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> 型锌指结构域,两者二级结构却十分一致。由此可见, *rnf141* 基因在脊椎动物中的进化非常保守。

为了解 *rnf141* 基因在胚胎发育阶段和成体组织器官中的表达情况,我们分析了斑马鱼 *rnf141* 基因的时空表达谱。杂交结果显示, *rnf141* 基因在斑马鱼胚胎中广泛表达,但在端脑、小脑和后脑中表达水平较高。此外,RT-PCR 检测结果也表明, *rnf141* 基因在成体斑马鱼多个组织(心脏、骨骼肌、大脑、胰腺、睾丸和卵巢)中均有表达,但以在睾丸中的表达丰度最高。上述结果提示, *rnf141* 基因除了参与斑马鱼胚胎发育过程(尤其是神经系统发育)和维持成体组织正常生理功能外,可能在雄性生殖细胞的发育过程中也扮演了重要角色。

必须指出,本研究中作者在斑马鱼各种组织中仅检测到一条转录体,而且该转录物也并非特异地表达于睾丸中,说明斑马鱼 *rnf141* 基因在表达模式上与人类 ZNF230 基因仍存在一定的差异。我们认为这种表达模式的差异与物种进化过程中基因功能的逐步多样性有关,对其合理的解释有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Fishman M C. Zebrafish—the canonical vertebrate[J]. Science, 2001,294:1290-1291.
- [2] Zhang S, Qiu W, Wu H, Zhang G, Huang M, Xiao C, et al. The shorter zinc finger protein ZNF230 gene message is transcribed in fertile male testes and may be related to human spermatogenesis[J]. Biochem J, 2001,359:721-727.
- [3] Strausberg R L, Feingold E A, Grouse L H, Derge J G, Klausner R D, Collins F S, et al. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences [J]. Proc Natl Acad Sci, 2002,99:16899-16903.
- [4] Westerfield M. The Zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish *Danio (Brachydanio) rerio* [M]. 3rd ed. Eugene; University of Oregon Press, 1993:51-55.
- [5] Laity J H, Lee B M, Wright P E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity[J]. Curr Opin Struct Biol, 2001,11:39-46.
- [6] Freemont P S. The ring finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger[J]. Ann N Y Acad Sci, 1993,684:174-192.
- [7] Qiu W, Zhang S, Xiao C, Xu W, Ma Y, Liu Y, et al. Molecular cloning and characterization of a mouse spermatogenesis-related ring finger gene *znf230* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003,306:347-353.

[本文编辑] 邓晓群

#### · 更正启事 ·

### 关于《汶川地震一个月后救援部队官兵心理健康状况调查》和《汶川县映秀镇抗震救灾部队营地苍蝇密度、分布及其控制》的更正

已发表在《第二军医大学学报》2008年第7期725页的《汶川地震一个月后救援部队官兵心理健康状况调查》和734页的《汶川县映秀镇抗震救灾部队营地苍蝇密度、分布及其控制》两篇论文,均以常文军和张迁为共同第一作者,特此更正。