

# 半滑舌鲷 HIRA 基因部分 cDNA 序列克隆及表达分析

刘姗姗<sup>1,2</sup> 张 静<sup>1</sup> 陈松林<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>2</sup> 深圳华大基因研究院, 518083)

**摘 要** 为研究 HIRA 基因在半滑舌鲷胚胎发育中的作用及其组织差异表达, 以半滑舌鲷为研究对象, 采用同源克隆策略从其精巢中分离了长度为 764bp 的 HIRA 部分 cDNA 序列, 该片段编码 254 个氨基酸, 具有 5 个 WD 结构域。对氨基酸进行比较发现, 半滑舌鲷 HIRA 与比较物种的氨基酸序列具有很高的同源性, 与红鳍东方鲀亲缘关系最近。实时定量 PCR 分析发现, HIRA mRNA 在多细胞期到原肠胚期的表达量较高, 表明 HIRA 对胚胎发育起重要作用; HIRA 在不同组织中表达差异显著, 其中在性腺中表达最高, 推测 HIRA 在维持性腺的功能方面有一定作用。

**关键词** HIRA 克隆 组织差异表达 胚胎发育 半滑舌鲷

**中图分类号** S96 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)06-0024-07

## HIRA gene of the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*: cloning and its mRNA expression

LIU Shan-shan<sup>1,2</sup> ZHANG Jing<sup>1</sup> CHEN Song-lin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup> Beijing Genomics Institute at Shenzhen, 518083)

**ABSTRACT** To investigate the function of HIRA gene in the embryonic development and tissue differential expression of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*, partial HIRA cDNA of 764 bp was isolated from *C. semilaevis* by homologous clone method. The fragment encodes peptide of 254 amino acids, and it shares high homology with *Taki fugu rubripes*'s HIRA gene as shown by the phylogenetic tree based on the neighbor-joining method. The HIRA gene may play a vital role in the embryonic development of *C. semilaevis*, supported by the relatively higher mRNA expressions of HIRA at early developmental stages as shown by real-time PCR analysis. In addition, HIRA mRNA expression was extremely high in gonads compared to the other tissues, which indicates that HIRA gene may also help gonads to maintain their normal functions.

**KEY WORDS** HIRA Clone Tissue differential expression  
Embryonic development Half-smooth tongue sole

真核生物细胞核中的染色质是以核小体为单位存在的。核小体由 DNA 和 4 种组蛋白(H2A、H2B、H3 和 H4)组装而成。首先 H3-H4 四聚体和 DNA 结合,然后两个 H2A-H2B 二聚体再结合上来组成八聚体颗粒(Polo *et al.* 2006; Akey *et al.* 2003)。然而,在许多物种的精细胞里,染色质却有着不同于八聚体的特殊结构,它们的染色质里存在着非组蛋白,称为精子核碱性蛋白(Sperm nuclear basic proteins,SNBPs),如鱼精蛋白(Protamine)(Poccia *et al.* 1996)。这种特殊的染色质高度凝缩,并且 DNA 没有转录活性,也不能复制(Wright *et al.* 1999)。在授精的过程中,精子进入卵子,其精子碱性核蛋白会被卵子细胞质中提供的组蛋白取代,从而重新形成核小体构成的染色质,形成雄性原核(Male pronucleus),这个过程称为精子染色质重构(Sperm chromatin remodelling, SCR)(Wright *et al.* 1999)。组蛋白调节基因(Histone regulation gene, HIRA)是一种保守的染色质装配分子伴侣,它能够帮助组蛋白组装到 DNA 上去,并且这个过程不依赖于 DNA 复制(Ray-Gallet *et al.* 2002)。体外实验证明,HIRA 参与了 H3-H4 二聚体的装配,这种二聚体含有一种特异的 H3 变体:H3.3 组蛋白(Tagami *et al.* 2004)。也有研究表明,在果蝇体内,HIRA 参与了 H3.3 组蛋白的装配。Loppin 等(2005)使用果蝇的一种 *sésame* 突变型(ssm)为材料,发现这种突变体在授精的过程中雄性原核不能正常形成,从而导致了受精卵不能正常发育。通过分析,HIRA 的基因突变是产生这种 ssm 突变体的主要原因。Bonney 等(2007)通过基因打靶敲除了果蝇的 HIRA 基因,结果发现突变个体虽然能够存活,但却是不育的。由于缺少了 HIRA 蛋白,精核不能参与到受精卵的形成过程。可以看出 HIRA 基因的表达对胚胎发育具有重要的作用。

在鱼类中,目前关于 HIRA 只有在鲫属鱼类和河鲀 *Fugu rubripes* 中有报道(Zhao *et al.* 2011; 郭秋红等 2010; 周 励等 2008; Du *et al.* 2008; 杜新征等 2007; 王玉凤等 2005; Llevadot *et al.* 1998),主要的研究方面是对 HIRA 基因的克隆以及表达分析。HIRA 基因在雌核发育银鲫 *Carassius gibelio* 和两性生殖彩鲫 *Carassius auratus* 胚胎发育过程中具有不同的转录表达模式,即银鲫 HIRA 基因(*cagHira*)在成熟的未受精卵和受精后的胚胎发育不同时期转录本的量变化并不显著,而彩鲫 HIRA 基因(*caHira*)在受精后转录本表达迅速下降,原肠期表达量又上升到成熟卵的水平,并一直维持到出苗期。研究还发现,HIRA 蛋白在银鲫的卵巢中特异表达,而在彩鲫的卵巢和肝脏中大量表达。HIRA 基因的确切功能目前还没有定论,前期研究总结发现,其不仅与组蛋白基因的转录调节有关,而且与核小体组装、调节染色质结构及细胞周期的进程等有关。

半滑舌鳎 *Cynoglossus semilaevis* 是属于鲽形目 Pleuronectiformes 的硬骨鱼类,主要产自中国黄渤海区,中国东海以及朝鲜、日本沿海也有一定的分布,其个体大、肉质高、味道鲜美,是重要的海水养殖经济鱼种。目前对半滑舌鳎胚胎发育过程及组织学观察报道较多(刘 美等 2008; 万瑞景等 2004; 杜 伟等 2004; 姜言伟等 1988),但鲜有对半滑舌鳎授精及胚胎发育的分子机制研究。本研究通过同源克隆的方法克隆了半滑舌鳎的 HIRA 部分 cDNA 序列,并设计特异的引物检测了 HIRA 在半滑舌鳎胚胎发育过程及雄性个体各组织中的表达状况,这为研究半滑舌鳎授精及胚胎发育的分子机制奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

人工养殖半滑舌鳎(2 龄的雌鱼、雄鱼、伪雄鱼各 3 尾,受精卵约 150 颗)2011 年 6 月采自山东海阳黄海水产公司。分别取 2 龄雄鱼(体重约 150 g)的性腺、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑、肌肉、皮肤、肠、鳃、垂体等组织,以及 2 龄雌鱼(体重约 400 g)和伪雄鱼性腺(体重约 200 g),液氮迅速冷冻后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中待用。通过人工诱导产卵,收集不同发育时期胚胎。将受精卵置于直径 15 cm 的培养皿中,在  $20\sim 21.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 值  $7.8\sim 8.6$ 、盐度 35 的过滤海水中培养(刘 美等 2008),每  $2\sim 3\text{ h}$  对受精卵和胚胎进行 1 次换水,收集多细胞期(4 hpf, 4 hour post fertilization, 即受精后 4 h)、囊胚期(8 hpf)、原肠早期(12 hpf)、原肠末期(16 hpf)、神经胚期(20 hpf)、尾芽形成期(25 hpf)、胚体绕卵黄囊  $1/2$ (28 hpf)、胚体绕卵黄囊  $3/4$ (32 hpf)、胚体绕卵黄囊  $4/5$ (36 hpf)和出膜前(38 hpf)的成活胚胎,保存于液氮中。上述样品均设 3 组重复。

## 1.2 实验试剂

RNA 提取试剂 Trizol Reagent 购自 Invitrogen; dNTPs、*rTaq*、DL2000 DNA Marker、反转录试剂盒 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、实时定量试剂盒 SYBR Premix Ex *Taq* (Perfect Real Time)、pMD18-T 载体均购自宝生物(大连)有限公司;胶回收试剂盒 Zymoclean Gel DNA Recovery Kit 购自 ZYMO Research 生物科技公司;大肠杆菌菌株 *E. coli* Top10 购自天根生化科技(北京)有限公司;其他试剂均为国产分析纯,购自国药集团。

## 1.3 方法

### 1.3.1 引物设计

实验用引物详见表 1。参照杜新征等(2007)设计的简并引物 HIRA-F1 和 HIRA-R1 进行同源克隆,根据获得的 HIRA 基因保守区片段设计特异性引物 HIRA-RT-F1 和 HIRA-RT-R1,以检测组织分布及胚胎期 HIRA mRNA 表达, $\beta$ -actin-F 和  $\beta$ -actin-R 作为内参引物扩增半滑舌鲷  $\beta$ -actin 基因,所有引物委托南京金斯瑞生物有限公司合成。

### 1.3.2 RNA 的提取和 cDNA 的合成

用 Trizol Reagent 法提取各组织及胚胎的总 RNA,NanoDrop 分光光度计测量 RNA 样品的纯度和浓度,再分别以相应的总 RNA 各 500 ng 为模板,按照 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 的操作步骤进行反转录,反应结束后采用内参引物  $\beta$ -actin 对 cDNA 进行检测。

表 1 相关引物及其碱基序列

Table 1 Primers and sequences used in this study

引物名称 Primer	引物序列 Sequence(5'-3')	退火温度 Annealing temperature(°C)
HIRA-F1	TTCAGTT(G)GACATC(T)CAT(C)CCTGATGG	60
HIRA-R1	AGCTTTA(C)CGG(A)TGA(T)CCCACG(A)AAGTC	
HIRA-RT-F1	CGGGACCTATGTCGTTGATTCTG	60
HIRA-RT-R1	TTGTTGGACCATCTCACGCACTT	
$\beta$ -actin-F	GCTGTGCTGTCCTGTA	60
$\beta$ -actin-R	GAGTAGCC-ACGCTCTGTC	

### 1.3.3 半滑舌鲷 HIRA 部分 cDNA 片段的克隆

以 HIRA-F1 和 HIRA-R1 为引物,半滑舌鲷精巢总 RNA 反转的 cDNA 为模板,扩增 HIRA 基因的保守区部分序列。PCR 反应体系为 10×Buffer 4  $\mu$ l、dNTPs 3.2  $\mu$ l、正反向引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ l、模板 cDNA 1  $\mu$ l、*rTaq* 0.5  $\mu$ l,加 RNase Free dH<sub>2</sub>O 至 40 $\mu$ l。反应程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,进行 30 个循环;最后 72 °C 延伸 7 min。

扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离后进行切胶回收、载体连接、转化、PCR 阳性克隆,由华大基因有限公司进行测序。

### 1.3.4 序列比较分析

对所获得的 HIRA 部分 cDNA 序列,采用 Blast n/p 程序进行同源搜索。用 ClustalW(Larkin *et al.*, 2007)程序将半滑舌鲷与 GenBank 中已有 HIRA 核苷酸和氨基酸序列进行同源性比较。利用分析软件 MEGA 4.0(Kumar *et al.*, 2008)以 Neighbor-Joining 法构建系统树,Bootstrap 设置为 1 000。所用到的其他物种的 GenBank 序列号详见表 2。用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)来进行 HIRA 蛋白结构预测和功能分析。

### 1.3.5 半滑舌鳎 HIRA mRNA 在组织及胚胎中的表达分析

取反转录得到的半滑舌鳎 cDNA 第一链为模板, HIRA-RT-F1 和 HIRA-RT-R1 为引物, 采用 ABI 7500 Real-time PCR 仪, 按照 SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) 使用说明, 进行荧光实时定量 PCR 反应。以半滑舌鳎  $\beta$ actin 为内参, 应用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法 (Livak *et al.* 2001) 确定各样品中 HIRA mRNA 的相对含量。反应体系为: SYBR Premix Ex Taq™ (2 ×) 10  $\mu$ l、ROX Reference Dye II 0.4  $\mu$ l、正反向引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.4  $\mu$ l、模板 cDNA 50 ng, 用 RNase Free dH<sub>2</sub>O 补齐至 20  $\mu$ l。反应条件为: 95 °C 预变性 30 s; 40 个循环包括 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 34 s; 熔解曲线反应条件为 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C

15 s。PCR 结束后确认 Real-time PCR 的扩增曲线及熔解曲线, 以确保其特异性。每个样品重复 3 次。得到的数据通过 SPSS 10.0 软件进行单因素试验统计分析和显著性检验,  $P < 0.01$  为显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 半滑舌鳎 HIRA 部分 cDNA 片段的克隆及序列分析

本研究通过同源克隆的方法得到的 HIRA 部分 cDNA 片段。经测序后发现半滑舌鳎这段 HIRA cDNA 序列长度为 764bp, 编码 254 个氨基酸 (图 1)。分析结果表明, 半滑舌鳎 HIRA 氨基酸序列中包含 5 个 WD40 结构域。将半滑舌鳎和 GenBank 中 15 种代表物种的 HIRA 氨基酸序列进行多序列比对和同源性比较, 结果发现, 半滑舌鳎 HIRA 基因片段氨基酸序列与硬骨鱼类的 HIRA 相似性为 93%~95%, 与其他脊椎动物的 HIRA 相似性为 81%~88%, 与无脊椎动物果蝇的 HIRA 相似性相对较低, 为 63%。使用 MEGA 软件基于各物种 HIRA 氨基酸序列构建了系统进化树, 结果表明, 所有鱼类的 HIRA 聚为一支, 半滑舌鳎与红鳍东方鲀的 HIRA 亲缘关系最近, 两栖类的非洲爪蟾和鸡则和哺乳类亲缘关系更近 (图 2)。通过 HIRA 氨基酸序列构建的进化树较为符合传统形态学和生化特征分类进化地位。

### 2.2 半滑舌鳎 HIRA mRNA 在胚胎期和各组织的表达分析

本研究利用荧光实时定量 PCR 技术检测了半滑舌鳎 HIRA 基因在胚胎不同发育阶段的表达状况。结果显示, HIRA mRNA 在多细胞期 (4 hpf) 到原肠末期 (16 hpf) 表达量较高 ( $P < 0.01$ ), 其中原肠末期的表达最高, 随后从神经胚期 (20 hpf) 开始, 表达量逐渐降低。但是在出膜前 (38 hpf) HIRA 的表达量又有所回升 ( $P < 0.01$ ) (图 3)。从表达量上可以看出, HIRA 在胚胎发育早期发挥了重要的作用。

同时也检测了 HIRA mRNA 在不同组织中的表达状况。HIRA mRNA 在大部分组织中均有表达, 尤其在伪雄性腺、雌性性腺和雄性性腺中表达量显著高于其他组织 ( $P < 0.01$ ), 而肌肉中表达水平极低 ( $P < 0.01$ ) (图 4)。在性腺中的高表达可能暗示 HIRA 在生殖细胞的发育过程中起到了重要的作用。

表 2 用于构建系统树的氨基酸序列 GenBank 序列号

Table 2 GenBank accession numbers of amino acid used for the phylogenetic tree construction

物种名称	Species	GenBank 序列号 GenBank No.
萍乡鲫	<i>Carassius auratus</i> Pingxiang	ADG60262
黑腹果蝇	<i>Drosophila melanogaster</i>	CAA10954
彩鲫	<i>Carassius auratus</i>	ABC59518
银鲫	<i>Carassius gibelio</i>	ABC59517
斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	XP_696478
红鳍东方鲀	<i>Takifugu rubripes</i>	NP_001027852
爪蟾	<i>Xenopus laevis</i>	CAC41093
鸡	<i>Gallus gallus</i>	BAC11842
黑线仓鼠	<i>Cricetulus griseus</i>	EGV97582
小鼠	<i>Mus musculus</i>	CAA68049
褐家鼠	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001129232
非洲象	<i>Loxodonta africana</i>	XP_003419218
马	<i>Equus caballus</i>	XP_001488524
野猪	<i>Sus scrofa</i>	XP_001927516
人	<i>Homo sapiens</i>	CAG30389

### 3 讨论

本研究克隆了半滑舌鳎的 HIRA 部分 cDNA 序列并检测了其在不同组织以及不同的胚胎发育阶段的表达状况。从获得的 cDNA 可以看出,HIRA 的结构在从低等的脊椎动物鱼类到高等的哺乳动物的长期进化中高度保守,含有 5 个 WD40 结构域,而 WD 结构域具有调节信号传递和 mRNA 前体加工的功能,推测半滑舌鳎 HIRA 蛋白可能也具有调节组蛋白基因表达的功能。

目前已有多种证据证明 HIRA 在胚胎发育过程中发挥了重要作用。在果蝇中,HIRA 可能是母源性的,在早期胚胎发育过程中可能起了特别重要的作用(Kirov *et al.* 1998)。对高等脊椎动物来说,HIRA 的突变则是致死性的,导致小鼠在原肠作用期就出现异常,如原条扭曲,所有突变体在胚胎发育期死亡(Kirov *et al.* 1997),说明 HIRA 基因对于脊椎动物的发育可能是必需的,而且在原肠作用时可能就发挥功能。对小鼠不同胚胎发育阶段的整体原位杂交表明,HIRA 在原肠作用开始后的阶段表达,表达范围很广,从早期发育的胚胎直到成体阶段都有表达,但在胚胎的头盖神经褶、额鼻区、前两对咽弓处、围咽神经嵴和肢芽处 HIRA 转录本的水平较高(Wilming *et al.* 1997)。而在果蝇中,HIRA 突变个体虽然能够成活,但却是不育的(Bonnefoy *et al.* 2007)。通过转基因技术制作 HIRA 过表达果蝇,发现其过表达胚胎也会出现大量死亡(王玉凤等 2005),可以看出 HIRA 表达量的控制对胚胎的发育也是非常重要的。此外,对鸡和小鼠的研究表明,HIRA 基因对胚胎期神经系统和心脏的发育至关重要(Roberts *et al.* 2002,1997),可以看出在不同的物种里,HIRA 的功能发挥存在差异。在胚胎发育过程中,HIRA 基因在雌核发育银鲫和两性生殖彩鲫胚胎发育过程中的转录表达模式也呈现不同,银鲫 HIRA 基因(*cagHira*)从成熟的未受精卵到受精后的胚胎发育各阶段转录本的量没有显著变化,而彩鲫 HIRA 基因(*ca-Hira*)在受精后转录本的量迅速下降,在受精后 30 min、多细胞期、桑椹期、囊胚期 4 个时期的表达量显著低于成熟卵期,到原肠期又上升至成熟卵期的水平,之后到出苗期没有大的波动(Du *et al.* 2008)。而半滑舌鳎 HIRA

```

1 AAAAGTCAACTGTAAGTAGGACTACCCCTGCTTTAAACGGTGGCCCCCTGTCCCCCTCCTA
1 F S V D I H P D G T K F A T G G Q G E D
61 AGACCCTTCCACTACTATACCTTGTACCGCGGCCATGAGGCCCTCCTCCTCTTCTTA
21 S G K V M I W N M A P V L R E E D E K N
121 CTCTTATAAGGGTTCTACGAAACGGTCTACCTGTTAGTGGATCGTACACACTTGACCGCAC
41 E N I P K M L C Q M D N H L A C V N C V
181 GCTACCAGGTTGTTACCCAAACATGGACCGTAGCCCTCCTCTACTGTTTCGACCAGTACCAC
61 R W S N N G L Y L A S G G D D K L V M V
241 ACCTCCTCTCGACGTAAGTAACCGGGCTGTGTCAAAACCTAGGTGCTCATTGACCGC
81 W R R A A F I G P S T V F G S S S K L A
301 TTGCACCTCGTACCGCAACGCAGTGGTAGGAATCCTTAGTGTGACCTCTACACTACCTG
101 N V E Q W R C V T I L R N H T G D V M D
361 CACCGAACAGAGGAGTACTGTACACCGAGCGGAGGACGTCGCAGCTGTTGTGATAGCAG
121 V A W S P H D M W L A S C S V D N T I V
421 TAGACCTTTCGGTGCCTTTAAAGGTCCTTTACCACTGTACAAACGCACCGGTTGACCCGAC
141 I W N A R K F P E M V T T L R N H T G D V M D
481 CAGTTCACAGACTGCACCCCTGGGTACCCATTTATGTAGCGGAGGGTCCGCTGTGCTGGTG
161 V K G L T W D P V G K Y I A S Q A D D H
541 TCAGACTTCCACCTCCTGCCACCTGACCGTCTACTCCGGTGTAGTGATTGGGAAG
181 S L K V W R T V D W Q M E A N I T K P F
601 TGACTCACACCCTGCTGGGTGCACGACGACAGCAGGACAGGGGCTACCAGTCACTG
201 T E C G G T T H V L R L S W S P D G Q Y
661 GACCACAGCCGAGTGCGGTACTTGTGAGGCCGGGTTGGCGAGTCTAGCACCTCTCTCTG
221 L V S A H A M N N S G P T A Q I V E R D
721 CCGACCTTTGGTTGTACCTGAAACACCTAGTAGCATTTCGATT
241 G W K T N M D F V D H R K A

```

黑色边框区域表示 WD 结构域

WD domains are in the black frames

图 1 HIRA 基因的部分 cDNA 序列和编码的氨基酸序列

Fig. 1 Part of the cDNA sequence and encoding amino acid sequence of HIRA gene

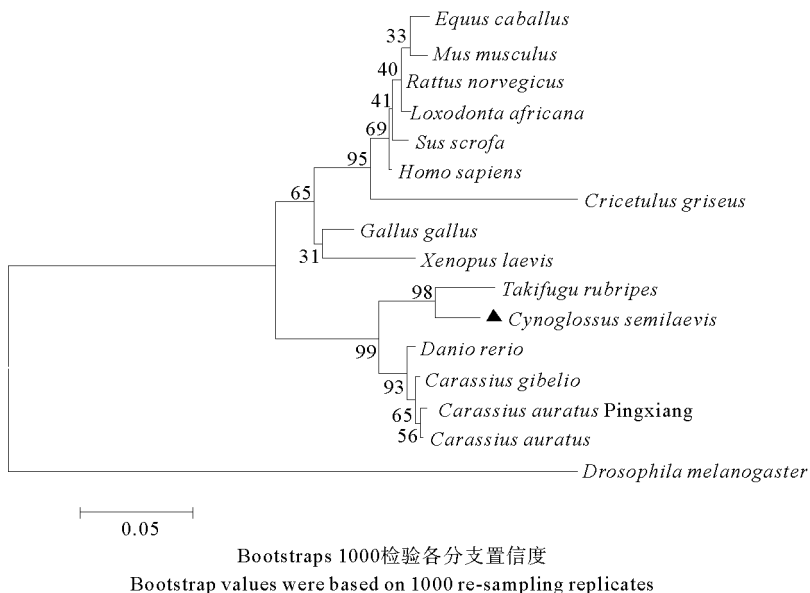
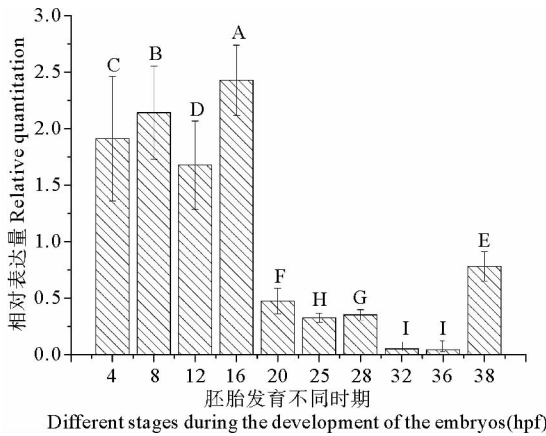


图 2 基于 NJ 法构建半滑舌鳎与其他动物 HIRA 氨基酸系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of HIRA amino acid sequences of *C. semilaevis* and other species based on the neighbor-joining method

此外,对鸡和小鼠的研究表明,HIRA 基因对胚胎期神经系统和心脏的发育至关重要(Roberts *et al.* 2002,1997),可以看出在不同的物种里,HIRA 的功能发挥存在差异。在胚胎发育过程中,HIRA 基因在雌核发育银鲫和两性生殖彩鲫胚胎发育过程中的转录表达模式也呈现不同,银鲫 HIRA 基因(*cagHira*)从成熟的未受精卵到受精后的胚胎发育各阶段转录本的量没有显著变化,而彩鲫 HIRA 基因(*ca-Hira*)

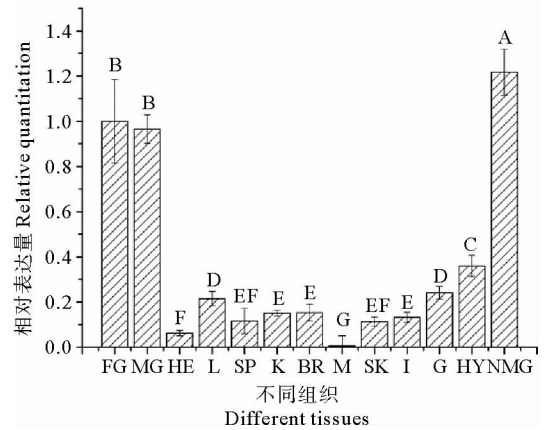


4: 多细胞期; 8: 囊胚期; 12: 原肠早期; 16: 原肠末期; 20: 神经胚期; 25: 尾芽形成期; 28: 胚体绕卵黄囊 1/2; 32: 胚体绕卵黄囊 3/4; 36: 胚体绕卵黄囊 4/5; 38: 出膜前; 大写字母不同表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )

4: Multi-cell stage; 8: blastula stage; 12: early gastrula stage; 16: late gastrula stage; 20: neural stage; 25: tail bud stage; 28: embryo encircling 1/2 of the yolk-sac; 32: embryo encircling 3/4 of the yolk-sac; 36: embryo encircling 4/5 of the yolk-sac; 38: pre-hatching stage

Different capital letters indicate significant differences with each other ( $P < 0.01$ )

图 3 HIRA mRNA 在半滑舌鲷胚胎不同发育时期表达分析  
Fig. 3 Expression analysis of HIRA mRNA in *C. semilaevis* at different embryonic development stage



BR: 脑; FG: 雌性性腺; G: 鳃; HE: 心脏; HY: 垂体; I: 肠; K: 肾脏; L: 肝脏; M: 肌肉; MG: 雄性性腺; NMG: 伪雄性性腺; SK: 皮肤; SP: 脾脏

大写字母不同表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )

BR: Brain; FG: female gonad; G: gill; HE: heart; HY: hypophysis; I: intestine; K: kidney; L: liver; M: muscle; MG: male gonad; NMG: neo-male gonad; SK: skin; SP: spleen

Different capital letters indicate significant differences with each other ( $P < 0.01$ )

图 4 HIRA mRNA 在半滑舌鲷不同组织中表达分析  
Fig. 4 Expression analysis of HIRA mRNA in tissues of *C. semilaevis*

在胚胎发育阶段的表达模式和这两种鲫鱼都不一致。在半滑舌鲷胚胎多细胞期直至原肠末期,HIRA 均有相对高量表达。虽然在检测方法上的差异,如半定量分析方法(研究银鲫和彩鲫中 HIRA 表达所采用方法)和实时定量分析方法的灵敏度不同,可能会造成不同研究之间数据的差异,但是还是可以推测,HIRA 对半滑舌鲷胚胎发育具有重要的作用。

在无脊椎动物果蝇中,HIRA 不仅主要在卵巢中转录表达,而且在精巢中也大量转录(Loppin *et al.* 2005)。在低等的脊椎动物中,彩鲫的 HIRA 在卵巢和肝脏中表达很强,在脑、心、脾、肾中表达较弱,在精巢和肌肉中没有表达,对维持肝脏和卵巢的功能方面可能有一定作用,而对精巢和肌肉的发育没有影响(杜新征等 2007)。银鲫中仅在卵巢中大量表达(Du *et al.* 2008)。在不同组织中,半滑舌鲷 HIRA 在性腺中表达较强,其表达模式与彩鲫和银鲫均有差异,而与果蝇的研究结果较为一致。对果蝇的研究表明,HIRA 基因的突变体可以存活,但导致雌性不育,精子入卵后精核不能完全解凝,卵细胞质中的组蛋白 H3.3 不能整合到精核中,因此不能形成正常的雄性原核(Loppin *et al.* 2005;Bonneyoy *et al.* 2007),说明果蝇 HIRA 基因产物对于精核解凝形成正常的雄性原核起关键作用。HIRA 在半滑舌鲷性腺中大量表达,可能对维持性腺的功能有一定作用,其中在伪雄鱼和雄鱼的精巢中高表达,可能为受精时精子进入卵后精核解凝形成雄性原核做准备。研究表明,HIRA 在硬骨鱼类中的表达模式不同,即使是在亲缘关系比较近的物种中也有不同的表现,暗示其可能存在不同的作用过程,对半滑舌鲷胚胎发育过程中 HIRA 作用分子机制的揭示还需要更深入的研究。

### 参 考 文 献

万瑞景,姜言伟,庄志猛. 2004. 半滑舌鲷早期形态发育特征. 动物学报, 50(1): 91-102

王玉凤,徐艳菊. 2005. Hira 基因的过量表达对果蝇早期胚胎发育的影响. 华中师范大学学报(自然科学版), 39(4): 530-533

刘美,李凤超,穆淑梅,康现江,苏文清. 2008. 半滑舌鲷胚胎发育组织学观察. 四川动物, 27(5): 737-739

杜伟,蒙子宁,薛志勇,姜言伟,庄志猛,万瑞景. 2004. 半滑舌鲷胚胎发育及其与水温的关系. 中国水产科学, 11(1): 48-53

- 杜新征, 王玉凤, 桂建芳. 2007. 彩鲫 *hira* 基因片段的克隆及表达分析. 水生生物学报, 31(2): 220-225
- 周 励, 王玉凤, 桂建芳. 2008. 银鲫 HIRA 多克隆抗体的制备及组织特异性表达分析. 水生生物学报, 32(3): 354-358
- 姜言伟, 万瑞景. 1988. 渤海半滑舌鳎早期形态及发育特征研究. 海洋水产研究, 9: 193-198
- 郭秋红, 赵占克, 王玉凤, 桂建芳. 2010. *Hira* 基因产物在银鲫和彩鲫卵子发生过程中的动态变化. 水生生物学报, 34(3): 611-617
- Akey CW, Luger K. 2003. Histone chaperones and nucleosome assembly. Struct Biol 13(1): 6-14
- Bonnefoy E, Orsi GA, Couble P and 1 other. 2007. The essential role of *Drosophila* HIRA for de novo assembly of paternal chromatin at fertilization. PLoS Genet 3(10): 1991-2006
- Du XZ, Zhou L, Zhao HB and 2 others. 2008. Identical sequences but different expression patterns of Hira gene in gynogenetic and gonochoristic crucian carps. Fish Physiol Biochem 34(2): 175-84
- Kirov N, Shtilbans A, Rushlow C. 1998. Isolation and characterization of a new gene encoding a member of the HIRA family of proteins from *Drosophila melanogaster*. Gene 212(2): 323-332
- Kumar S, Nei M, Dudley J and 1 other. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Briefings in Bioinformatics 9(4): 299-306
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP and 10 others. 2007. ClustalW and ClustalX Version 2.0. Bioinformatics 23(21): 2947-2948
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Methods 25(4): 402-408
- Llevadot R, Estivill X, Scambler P and 1 other. 1998. Isolation and genomic characterization of the TUPLE1/HIRA gene of the pufferfish *Fugu rubripes*. Gene 208(2): 279-83
- Loppin B, Bonnefoy E, Anselme C and 3 others. 2005. The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. Nature 437(7063): 1386-1390
- Poccia D, Collas P. 1996. Transforming sperm nuclei into male pronuclei in vivo and in vitro. Dev Biol 34: 25-88
- Polo SE, Almouzni G. 2006. Chromatin assembly: A basic recipe with various flavours. Genet Dev 16(2): 104-111
- Ray-Gallet D, Quivy JP, Scamps C and 3 others. 2002. HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. Mol Cell 9(5): 1091-1100
- Roberts C, Daw SC, Halford S and 1 other. 1997. Cloning and developmental expression analysis of chick Hira(Chira), a candidate gene for DiGeorge syndrome. Hum Mol Genet 6(2): 237-245
- Roberts C, Sutherland HF, Farmer H and 6 others. 2002. Targeted mutagenesis of the Hira gene results in gastrulation defects and patterning abnormalities of mesoendodermal derivatives prior to early embryonic lethality. Mol Cell Biol 22(7): 2318-2328
- Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G and 1 other. 2004. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. Cell 116(1): 51-61
- Wilming LG, Snoeren CA, van Rijswijk A and 2 others. 1997. The murine homologue of HIRA, a DiGeorge syndrome candidate gene, is expressed in embryonic structures affected in human CATCH22 patients. Human Molecular Genetics 6(2): 247-258
- Wright SJ. 1999. Sperm nuclear activation during fertilization. Curr Top Dev Biol 46: 133-178
- Zhao ZK, Li W, Wang MY and 3 others. 2011. The role of HIRA and maternal histones in sperm nucleus decondensation in the gibel carp and color crucian carp. Mol Reprod Dev 78(2): 139-47