

# 黄鳝性腺高表达的核糖体蛋白基因

商璇, 何焱, 张雷, 何春江, 夏来新, 高尚, 郭一清, 程汉华, 周荣家

(武汉大学生命科学院发育生物学研究中心, 武汉 430072)

**摘要:**采用高密点阵技术从黄鳝雄性性腺 cDNA 文库中获得 8 个克隆, 序列分析和 BLAST 结果显示它们编码的蛋白质分别与 40S 核糖体蛋白 S4, S9, S16, S17, S20 和 60S 核糖体蛋白 L7, L18a, L29 高度同源。根据黄鳝 RP 蛋白序列和其他物种的相应同源序列构建 ML 系统发生树, 显示核糖体蛋白基因在进化中高度保守。核糖体蛋白基因不仅可作为分子进化分析的有利工具, 而且从它们的表达模式显示 RP 基因除具有看家基因的功能外, 很有可能参与包括性腺分化等过程的发育调控。

**关键词:**核糖体蛋白; 黄鳝; 性别决定

中图分类号: Q591.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)02-0227-04

## Ribosomal Protein Genes Highly Expressed in Swamp Eel Gonads

SHANG Xuan, HE Yan, ZHANG Lei, HE Chun-Jiang, XIA Lai-Xin, GAO Shang, GUO Yi-Qing,

CHENG Han-Hua, ZHOU Rong-Jia

(Center for Developmental Biology, College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** 8 cDNA clones were isolated from a cDNA library prepared from swamp eel testies by macroarray. DNA sequence analysis and database search showed that they encode 8 proteins which are highly homologous to 40S ribosomal proteins S4, S9, S16, S17, S20 and 60S ribosomal proteins L7, L18a, L29. Phylogenetic trees (ML) based on ribosomal protein genes from swamp eel and other organisms were reconstructed, which showed that ribosomal protein genes were highly conserved during evolution. These results suggested that ribosomal protein genes as house keeping genes may play roles in developmental regulation such as sexual differentiation and could also be used as markers for the study of molecular evolution.

**Key words:** ribosomal protein; swamp eel; sex determination

核糖体是细胞中最古老的分子机器, 它负责制造所有细胞所需的蛋白质。从生物界分为原核生物和真核生物两大类开始, 核糖体的结构和功能几乎没有改变。由于核糖体对细胞来说是如此重要, 对于它们的结构组成——核糖体蛋白 (ribosomal protein, RP) 和核糖体 RNA (rRNA) 的研究一直是遗传学研究的重要领域<sup>[1~3]</sup>。

哺乳动物的核糖体由 79 个 RPs 和 4 种 RNA 组成<sup>[2]</sup>。其中, 18S rRNA 和 32 种 RPs 组成 40S 核糖体, 而 28S rRNA、5S rRNA、5.8S rRNA 和 47 种 RPs 组成 60S 核糖体<sup>[1,2]</sup>。由于从细菌到高等生物的广泛物种中都存在, 核糖体已经成为研究分子进化的重要大分子。而 RPs 具有许多成员, 可以提供大量的同源序列用于分析, 因此比 rRNA 更适合于作为

收稿日期: 2004-04-02; 修回日期: 2004-08-17

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30370771), 教育部科学技术研究重点项目 (编号: 104249) 资助 [Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30370771) and by the Key Project of Chinese Ministry of Education (No. 104249)]

作者简介: 商璇 (1980—), 女, 硕士, 研究方向: 动物遗传学。E-mail: shangrabbit@163.com

通讯作者: 周荣家 (1961—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 动物遗传学。E-mail: rjzhou@public.wh.hb.cn

系统发生研究的工具。人类所有的 79 个 RPs 的结构与功能都已基本清楚,但在脊椎动物的最大家族——硬骨鱼类中,虽然已有一些研究<sup>[4,5]</sup>,但 RPs 的结构和它们的编码基因还未被了解透彻。本研究在对黄鳝性腺高密度膜的差异杂交研究中,分离了 5 个 40S 核糖体蛋白和 3 个 60S 核糖体蛋白的同源序列,并与其他物种的相应蛋白序列进行多序列比对,构建了系统发生树,为鱼类核糖体蛋白研究提供了新的分子资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

黄鳝购于武汉大东门水产市场,取性腺作冰冻切片,HE 染色后判断性别。黄鳝雄性性腺 cDNA 文库为本室构建,采用 Clontech 公司 Creator™ SMART™ cDNA Library construction Kit。杂交膜为 Amersham 公司的 Hybond-N<sup>+</sup>, mRNA 提取试剂盒 PolyA Tract System 1000, MMLV 反转录酶为 Promega 公司产品,测序由上海申能博彩公司完成。

#### L29 (64 aa)

MAKSKNHTTHNQSRKAHRNGIKKPRSQRYESLKGVDPKFLRNMRFACKHNKKGMKAAQKAAQAK

#### S16 (146 aa)

MPAKGPLQSQVQVFRGKKTATAVAHCKRGNGLIKVNGRPLEMVEPATLQYKLEPVLVLLGKERFAGVDIRVRVKGGGHVA  
QIYAIRQAISKALVAYYQKYVDEASKKEIKDILIQYDRITLLVADPRRCESKFKGGPGARARYQKSYR

#### S20 (119 aa)

MAFKDTGKAPVETEVAIHRIRITLTSRNVKSLEKVCADLIRGAKEKNLKVKGPMPTKTLRITRKTTPCGEGSKTWDRF  
QMRIHKRLIDLHSPSEIVKQITSISIEPGEVEVTIADA

图 1 由全长 cDNA 序列推导的黄鳝 RP 基因蛋白质序列

Fig. 1 Deduced protein sequences of swamp eel RP gene

### 2.2 RP 基因的结构特征

完整的 3 个基因 S20, S16 和 L29 编码区、5'-UTR 和 3'-UTR 长度列于表 1。所有的 8 个基因都在第一个 ATG 处起始,完整的 3 个基因以 TAA 为终

表 1 黄鳝 3 个完整 RP 基因 cDNA 的结构特征

Table 1 Structural characteristics of the cDNAs encoding ribosomal proteins of swamp eel

基因 Gene	编码区长度 Coding region (bp)	5'-UTR 长度 5'-UTR (bp)	3'-UTR 长度 3'-UTR (bp)	PolyA 信号 Poly(A) <sup>+</sup> signal
S16	441	34	35	AATAAA
S20	360	81	24	AATAAA
L29	195	48	59	AATAA

### 1.2 方法

常规碱裂解法提取了 9 216 个黄鳝雄性性腺 cDNA 文库克隆质粒,采用 Genetix 公司 QPix 仪器,点于 Hybond-N<sup>+</sup> 膜,制备高密度膜。按 PolyA Tract System 1000 试剂盒说明书提取雌性黄鳝性腺 mRNA,随机引物法,<sup>32</sup>P-dCTP 为标记制备差异探针。68℃ 预杂交 3 h,加入探针后 68℃ 杂交 20 h。选取强信号克隆进行测序,序列在 GenBank 在线进行 BLAST 分析。将获得的序列用 VectorNTI 等软件进行分析。利用 Clustal X 软件进行多序列比对。用 Treepuzzle 软件构建 ML 系统进化树。

## 2 结果

### 2.1 8 个黄鳝 RP 基因的克隆

由于 RP 基因在细胞中属于高度表达的看家基因,所以在 cDNA 文库中以高水平存在。将杂交获得的呈强阳性信号的克隆测序,8 个克隆的序列分析发现与 40S 核糖体蛋白 S4, S9, S16, S17, S20 和 60S 核糖体蛋白 L7, L18a, L29 高度同源。其中 S20, S16 和 L29 含有完整的 ORFs(图 1)。

止密码子,这些特征与 channel catfish 的 RP 基因类似<sup>[4,5]</sup>。但脊椎动物中最常用的终止密码子却是 TGA<sup>[6]</sup>。

### 2.3 黄鳝 3 个完整 RP 基因与其他物种的 RP 基因的同源性分析

对 3 个完整 RP 基因的氨基酸序列分析后发现,它们与哺乳动物和其他鱼类的相应基因非常类似(表 2)。氨基酸的数目在进化中高度保守。S16 和 S20 的氨基酸数目在鱼类、小鼠和人类中完全一致,同源性也在 95% 以上。但黄鳝(*swamp eel*)的 L29 基因的氨基酸数目和同源性小鼠和人类差异较大,与运河鲶鱼(*channel catfish*)却很相似,这说明 L29 基因可能在进化中发生一定变异。

表 2 黄鳝 *RP* 基因与其他物种的 *RP* 基因的同源性比较

Table 2 Comparison of ribosomal protein similarity among swamp eel and other organisms

基因 Gene	氨基酸数量 Number of amino acids				相似性 Similarity to (%)		
	黄鳝	运河鲶鱼	小鼠	人类	运河鲶鱼	小鼠	人类
	Swamp eel	Channel catfish	Mouse	Human	Channel catfish	Mouse	Human
S16	146	146	145	146	99.3	95.9	99.3
S20	119	119	119	119	98.3	98.3	98.3
L29	64	64	160	159	87.5	34.4	34.6

2.4 *RP* 基因的进化树分析

由于 *RP* 基因的独特生物学特性,它们对进化分析具有理论意义和实际意义。许多 *RP* 基因已成为进化分析中的分子标准<sup>[7]</sup>。所有用于构建进化树的 *RP* 基因的序列数据源自 GenBank 数据库。本

文共选取了脊椎动物中的模式生物的 19 个 *RP* 基因的相应全长氨基酸编码序列(包括本实验室获得的黄鳝 *RP* 基因序列)作为分析对象,使用 Treepuz-zle 软件,构建 ML (Maximum Likelihood, 最大似然法)进化树(图 2)。

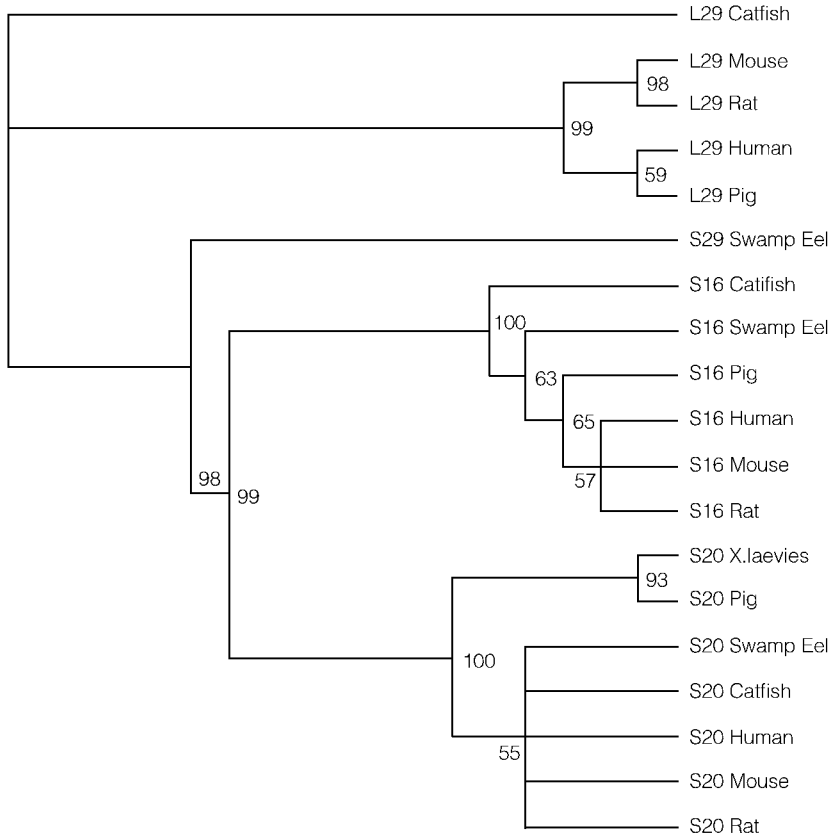


图 2 *RP* 的系统进化树

Fig.2 The phylogenetic tree of *RP*

Sequences from GenBank: L29Catfish (AAK95156), L29Mouse (P47915), L29Rat (P25886), L29Human (P47914), L29Pig (Q95281), S16Catfish (AAK95199), S16Mouse (P14131), S16Rat (P17008), S16Human (P17008), S16Pig (Q29201), S20Catfish (AAK95203), S20Mouse (NP\_080423), S20Rat (AAK95156), S20Human (P17075), S20Pig (AAS55928), S20X.laevies (P23403).

All Swamp Eel sequences were cloned by our lab.

## 3 讨论

### 3.1 *RP* 基因的分子进化研究

分子生物学发展起来后,进化遗传分析逐渐集中在分子水平<sup>[8~10]</sup>。由于不同的研究人员使用不同的建树方法和不同的基因序列作为标准,得到的结论并不一定互相吻合,更好的分子标准还在探索之中。Veuthey<sup>[7]</sup>利用核糖体蛋白同源性比较的方法推测 3 大真核生物群真菌、植物和动物间的进化遗传关系,获得了较好的结果。提示 *RP* 基因成为进化遗传分析中的重要分子:(1)*RP* 基因广泛存在于从低等到高等的各类生物中,而且许多物种的 *RP* 基因序列已被测出,新的序列也在不断添加;(2)*RP* 基因的分子分类十分清楚,可以避免不适当地将蛋白家族中隐蔽性同源进化和定向同源进化混淆的错误。WANG<sup>[11]</sup>用 RPS7 的第一内含子序列对鲤科鱼类间的亲缘关系进行分析,并认为使用这一内含子序列构建的进化树比使用细胞色素 b 序列构建的进化树可信度更高。从本文用 *RP* 基因序列构建的进化树也可看出,其结果基本符合现在公认的进化关系。说明 *RP* 基因是分子进化遗传分析的合适分子。

### 3.2 *RP* 的生物学功能

*RP* 作为核糖体的组成成分,是生命活动的重要部件。但在后续的研究中发现,*RP* 基因的表达量并不恒定,它在不同的遗传背景下表现为差异表达,推测,*RP* 基因还可能其他的生物学功能。

目前,有关 *RP* 的起源有两种假说:(1)*RP* 是专为组成核糖体而出现的;(2)*RP* 本来存在并具有自身特定的功能,后来才演化为核糖体的组成部分。现在已有很多直接和间接的证据证明 *RP* 除了是核糖体的组成因子外,还有许多别的生物学功能。

如 Bevort<sup>[12]</sup>等在用视黄醛诱导人 NTERA2 细胞神经元分化时发现 23 个 *RP* 因子表达下调。而人的 RPS10<sup>[13]</sup>在结肠癌组织的表达中明显高于正常组织。*RP* 因子在细胞分化前后表达不恒定的事实提示,*RP* 基因很有可能参与发育调控。

*RPS4* 具有两种同源异型体,分别位于人的 X 和 Y 染色体上。*RPS4X* 不受 X 染色体失活的影响,但 XO 表型的个体可能缺少 *RPS4* 蛋白质。Fisher<sup>[14]</sup>的研究证明,*RPS4* 的缺乏可能导致泰勒氏综合症,及女性生殖器官功能低下等组织畸形。

这些实验说明 *RP* 基因也与某些遗传病的发生有关系。*RP* 在黄鳍不同性腺存在差异表达,这是否表明它们也参与性别分化发育,还有待进一步研究。

### 参考文献(References):

- [1] Wool I G. The structure and function of eukaryotic ribosomes. *Annu Rev Biochem*, 1979, 48: 719~754.
- [2] Wool I G, Chan Y L, Gluck A. Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochem Cell Biol*, 1995, 73: 933~947.
- [3] Draper D E, Reynaldo L P. RNA binding strategies of ribosomal proteins. *Nucl Acids Res*, 1999, 27: 381~388.
- [4] Karsi A, Patterson A, Feng J, Liu Z. Translational machinery of channel catfish: I. A transcriptomic approach to the analysis of 32 40S ribosomal protein genes and their expression. *Gene*, 2002, 291: 177~186.
- [5] Patterson A. Translational machinery of channel catfish: Complementary DNA and expression of the complete set of 47 60S ribosomal proteins. *M Sc Thesis, Auburn University*, 2001, 57.
- [6] Cavener D R, Ray S C. Eukaryotic start and stop translation sites. *Nucleic Acids Res*, 2001, 19: 3185~3192.
- [7] Veuthey A L, Bittar G. Phylogenetic relationships of fungi, plantae, and animalia inferred from homologous comparison of ribosomal proteins. *J Mol Evol*, 1998, 47: 81~92.
- [8] Miya M, Kawaguchi A, Nishida M. Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: A case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences. *Mol Biol Evol*, 2001, 18(11): 1993~2009.
- [9] Kumar S, Rzhetsky A. Evolutionary relations of eukaryotic kingdoms. *J Mol Evol*, 1996, 42: 183~193.
- [10] Doolittle R F, Feng D F, Tsang S, Cho G, Little E. Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. *Science*, 1996, 271(26): 470~477.
- [11] Wang X, He S, Chen Y. Sequence variations of the S7 ribosomal protein gene in primitive cyprinid fishes: Implication on phylogenetic analysis. *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47(19): 1638~1643.
- [12] Bevort M, Leffers H. Down regulation of ribosomal protein mRNAs during neuronal differentiation of human NTERA2 cells. *Differentiation*, 2000, 66: 81-92.
- [13] Frigerio J M, Berthezene P, Garrido P, Ortiz E, Barthelmy S, Vasseur S, Sastre B, Seleznieff I, Dngorn J C, Iovanna J L. Analysis of 2166 clones from a human colorectal cancer cDNA library by partial sequencing. *Hum Mol Genet*, 1995, 4: 37~43.
- [14] Fisher E M, Beer-Romero P, Brown, Ridley A, McNeil J A, Lawrence J B, Willard H F, Beiber F R, Page D C. Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell*, 1990, 63: 1205~1218.