

彩鲫 *hira* 基因片段的克隆及表达分析

杜新征¹ 王玉凤¹ 桂建芳²

(1. 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079; 2. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: *hir/ hira* 基因最先作为组蛋白基因表达的一种负调节因子从酵母中被鉴定出来。现已证实, HIRA 包含一组保守的蛋白家族, 广泛存在于低等真核生物、无脊椎动物和脊椎动物等多种生物体当中, 为生命发育所必需。关于 *hira* 基因在动物发育过程中的具体作用研究还不是很多, 为了进一步探讨 *hira* 基因在鱼类发育过程中的作用, 作者根据已知 *hira* 基因保守序列设计一对简并引物, 分别以彩鲫基因组 DNA 和卵巢 cDNA 为模板克隆了彩鲫 *hira* 基因 (*Cahira*) 片段, 该片段基因组序列为 2181bp, 基因组片段含有 6 个内含子, 长度分别为 118bp、275bp、372bp、84bp、472bp、86bp; cDNA 序列为 759bp, 编码 253 个氨基酸, 具有 5 个 WD 结构域。对其氨基酸序列进行比较, 结果表明, 彩鲫 *hira* 基因的氨基酸序列与河鲈、爪蟾、鸡、小鼠、人的 *hira* 基因氨基酸序列具有非常高的同源性, 分别高达 92%、89%、89%、87% 和 88%。组织特异性表达分析表明, 所检测的彩鲫组织除了精巢和肌肉中未检测到 *hira* 基因表达外, 其余组织均有表达。其中卵巢和肝脏中表达很强, 而在脑、心、脾、肾中表达较弱, 说明该基因可能在维持卵巢和肝脏组织的功能方面起一定作用。

关键词: 彩鲫; *hira* 基因; 克隆; 组织表达

中图分类号: Q343 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2007)02-0220-06

hir/ hira (histone regulation) 基因是组蛋白基因表达的负调节因子。它最先是在酵母中被鉴定出来的, 后续的研究发现, *hira* 基因产物包含一组保守的蛋白家族, 广泛存在于从酵母、果蝇、鱼、爪蟾、鸡到哺乳动物小鼠和人类等多种生物体当中^[1-7]。在酵母中该基因被称为 *hir*, 而在高等生物中称为 *hira*。虽然 *hira* 基因产物的氨基酸序列比较保守, 但是在不同物种中其作用不尽相同。在酵母中的研究表明, *hir* 基因与核小体形成和异染色质基因沉默有关^[8, 9], 此外, HIR 对动原体 (kinetochore) 的建立具有重要作用, 这个作用和染色质重组因子 1 (CAF-1) 在这方面的功能相重叠^[10]。Kirov 等和 Llevadot 等先后在果蝇中发现了 HIRA 家族的成员 DHIRA。RT-PCR 和原位杂交显示, 它们在早期胚胎发育过程中可能起了特别重要的作用^[2, 11]。*hira* 在高等脊椎动物中的功能研究比较深入。主要由于它定位于人

类染色体的 22q11 区, 该区含有一个与许多先天性疾病, 如迪格奥尔格综合症 (Di George syndrome, DGS) 有关的关键部位。对鸡和小鼠的研究发现, *Hira* 在神经嵴以及由神经嵴发育而来的组织中大量表达, *hira* 突变所引起的许多表型与 DGS 的表型一致, 如心脏发育缺陷、胸腺发育不全等^[5, 12]。

Loppin 等在研究 *sesame* 基因的时候, 发现它与 *hira* 基因功能有关。*sesame* 突变的母体产下的卵是不育的, 这些卵受精时, 进入卵中的精子停滞在雄性原核形成期的染色质去浓缩后期, 尽管雄性原核的膜可以形成, 但精子的核不能完全去浓缩, 因此父本的染色体不能参与到子代的发育过程中去^[13]。在这些受精卵中, *sesame* 对母源性组蛋白整合入雄性原核产生影响, 从而使得精子不能进行染色质的重新组装^[14]。最近该研究小组通过一系列的研究发现, *sesame* 实际上是 *hira* 基因的一个点突变。作为

收稿日期: 2006-01-11; 修订日期: 2006-12-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 30671609); 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放基金项目 (2005FB20) 资助

作者简介: 杜新征 (1979—), 女, 汉族, 山东蒙阴人; 硕士; 主要从事发育生物学方面的研究

通讯作者: 王玉凤, E-mail: yfengw@mail.ccnu.edu.cn; 桂建芳, E-mail: jfgui@ihb.ac.cn

组蛋白 H3.3 的伴侣蛋白,HIRA 复合体的作用可能在于,当精子入卵后,去除精核中的鱼精蛋白,并将 H3.3-H4 四聚体沉积到精核中,从而使得精核解除浓缩状态,形成雄性原核参与到子代的发育过程中去^[15]。*hira* 基因在鱼类中的研究比较少,仅 Llevadot 等在河鲀 *Fugu rubripes* 中首先分离出 *hira* 基因^[3],但对该基因在鱼类发育过程中的作用未作说明。考虑到在雌核发育银鲫受精卵中,也有精核不解凝或解凝不完全的现象^[16],可能也是与精核特异性组蛋白在受精时不能被完全取代有关,为此我们对雌核发育银鲫和两性生殖彩鲫中 *hira* 基因的存在及异同等情况进行研究,以进一步探讨银鲫雌核发育的分子调控机制。本文报道了彩鲫 *hira* 基因片段和 cDNA 片段的序列特征以及该基因的组织表达特异性,为进一步研究 *hira* 基因在鱼类发育过程中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料 彩鲫取自中国科学院水生生物研究所关桥试验基地,于 2005 年 3 月取成熟一龄鱼用于实验。对 RT-PCR 实验,取 3 尾鱼的各组织样品用于生物学重复。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 取彩鲫的卵巢,常规酚-氯仿法提取基因组 DNA。

1.2.2 总 RNA 提取 用 SV Total RNA Isolation 试剂盒(Promega 公司)提取彩鲫卵巢的 RNA 及脑、心、肝、脾、肾、肌和精巢等组织 RNA,具体步骤按照试剂盒说明书。

1.2.3 第一链 cDNA 的合成 在新的 0.5mL Eppendorf 管中,依次加入 15μL RNA,1μL Oligo (dT)₁₅ (10mmol/L),70℃ 水浴 10min,然后立即置于冰浴中冷却。冰上加入 5×buffer 5μL, dNTP (10 mmol/L each) 2μL,反转录酶(RNase H Reverse Transcriptase 购自 invitrogen 公司) 100U, RNA 酶抑制剂(购自 invitrogen 公司) 20U,置于 42℃ 60min,最后 70℃ 10min 终止反应。合成的 cDNA 置于 -20℃ 保存备用。

1.2.4 PCR 扩增 根据已发表的河鲀、爪蟾、鸡、小鼠、人 *hira* 基因编码区的保守序列,设计了一对简并引物。正向引物:5'-TTCAGTT (G) GACATC (T)

CAT (C) CCTGATGG-3'; 反向引物 5'-AGCTTTA (C) CGG (A) TGA (T) CCCACG (A) AAGTC-3'。然后根据所测序列设计一对特异引物,用于组织表达分析。正向引物:5'-TGTCAGATGGACAATCACTTG-3'; 反向引物 5'-GACCTTCAGGCTGTGATCATC-3'。引物由上海生工合成。PCR 反应时,20μL 反应体系中含正向引物和反向引物各 1μL (3μmol/μL), cDNA 0.5μL (或基因组 DNA 2μL), LC Taq (购自 MBI 公司) 0.5U, dNTP 0.5μL (10mmol/L), 10×Buffer 2μL, Mg²⁺ (25mmol/L) 2.4μL, 补 ddH₂O 至 20μL。样品 94℃ 预变性 4min, 然后按下述条件进行 PCR 扩增反应: 94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 3min, 循环 36 次后 72℃ 延伸 10min, 扩增完毕后置 4℃ 终止反应。

1.2.5 PCR 产物的克隆与测序 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 选择大小与设计的彩鲫 *hira* 基因片段相符合的单一 DNA 条带回收、纯化, 纯化的 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接, 重组子转化 DE3 大肠杆菌, 培养过夜; 随机挑取白色菌落, 用 PCR 方法筛选阳性克隆。将鉴定的 3—5 个阳性克隆送交联合基因公司进行测序。

1.2.6 序列分析 应用 DNAMAN 分析软件将所得 DNA 序列翻译成蛋白质序列, 并用 BLAST 搜索引擎查询 GenBank/ EMBL 数据库, 获得同源的蛋白质序列。多序列比对采用 ClustalW 软件。

2 结果

2.1 彩鲫基因片段的扩增和克隆 根据已发表的河鲀、爪蟾、鸡、小鼠、人 *hira* 基因编码区的保守序列, 设计了一对简并引物, 分别以基因组 DNA 和由 RNA 逆转录得到的 cDNA 为模板, 扩增彩鲫 *hira* 基因, PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 显示片段大小分别约 2kb 和 750bp。将 PCR 产物回收, 与克隆载体 pMD18-T 连接, 转化 DE3 大肠杆菌, 培养过夜。随机挑选单个白色菌落, 培养检测, 获得若干个阳性克隆。

测序结果表明, 基因片段含有 6 个内含子, 长度分别为 118bp、275bp、372bp、84bp、472bp、86bp; 编码区序列长度为 759bp, 编码 253 个氨基酸, 预计编码蛋白的分子量为 28181.06D, 等电点为 6.595, 具有 5 个 WD 结构域(图 1)。

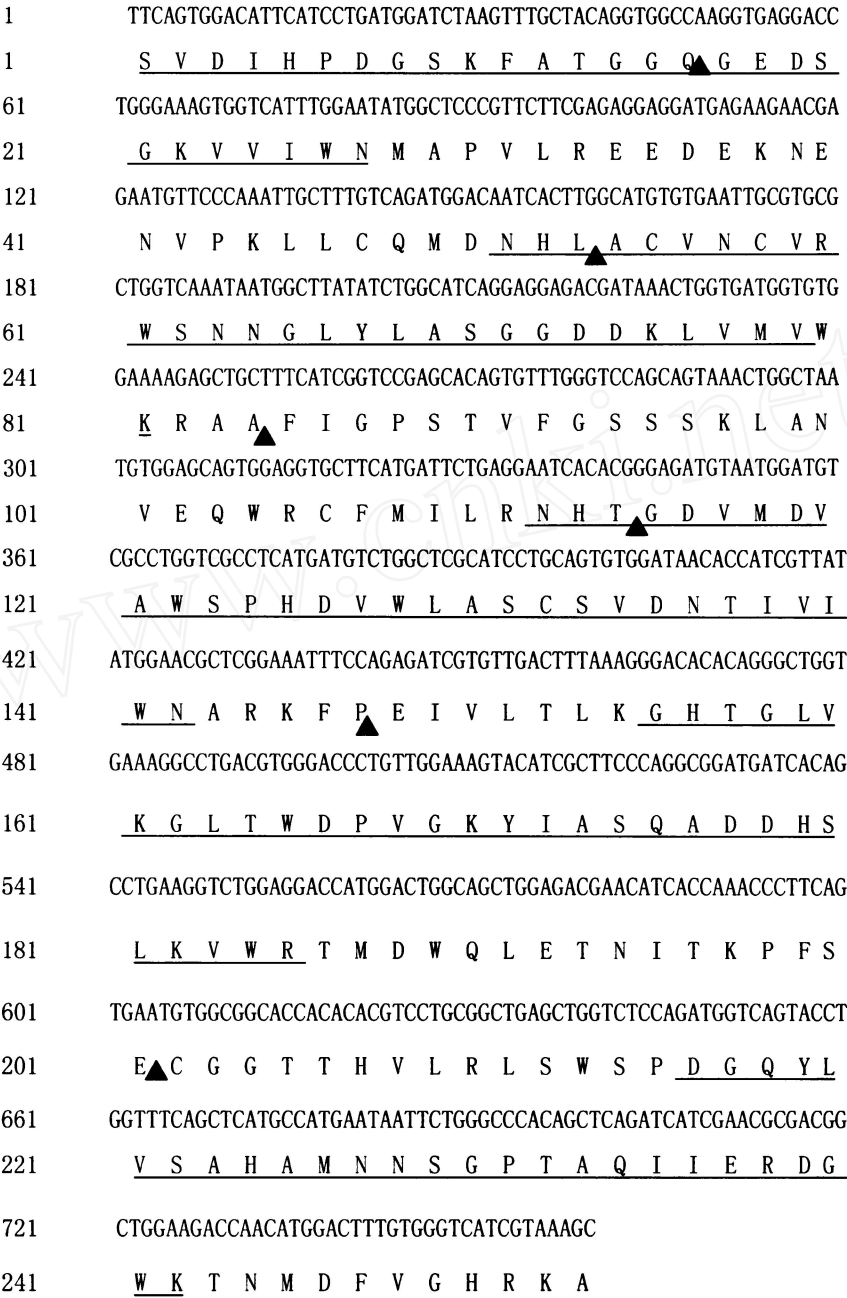


图1 彩鲫 *hira* 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列(下划线示 WD 结构域,三角示内含子插入处)

Fig.1 cDNA sequence and derived amino acid sequences of *hira* gene in color crucian carp *Carassius auratus* (WD domains are underlined and intron positions are indicated by filled arrowheads)

2.2 同源性分析

运用 ClustalW 软件对彩鲫的 *hira* 基因与其他物种 *hira* 基因的核苷酸序列进行比较,发现其外显子区域同源性很高,而内含子区域同源性很低。对其

氨基酸序列进行比较,结果表明,彩鲫 *hira* 基因的氨基酸序列与河魮、爪蟾、鸡、小鼠、人的 *hira* 基因氨基酸序列具有非常高的同源性(图 2),分别高达 92 %、89 %、89 %、87 %和 88 %。

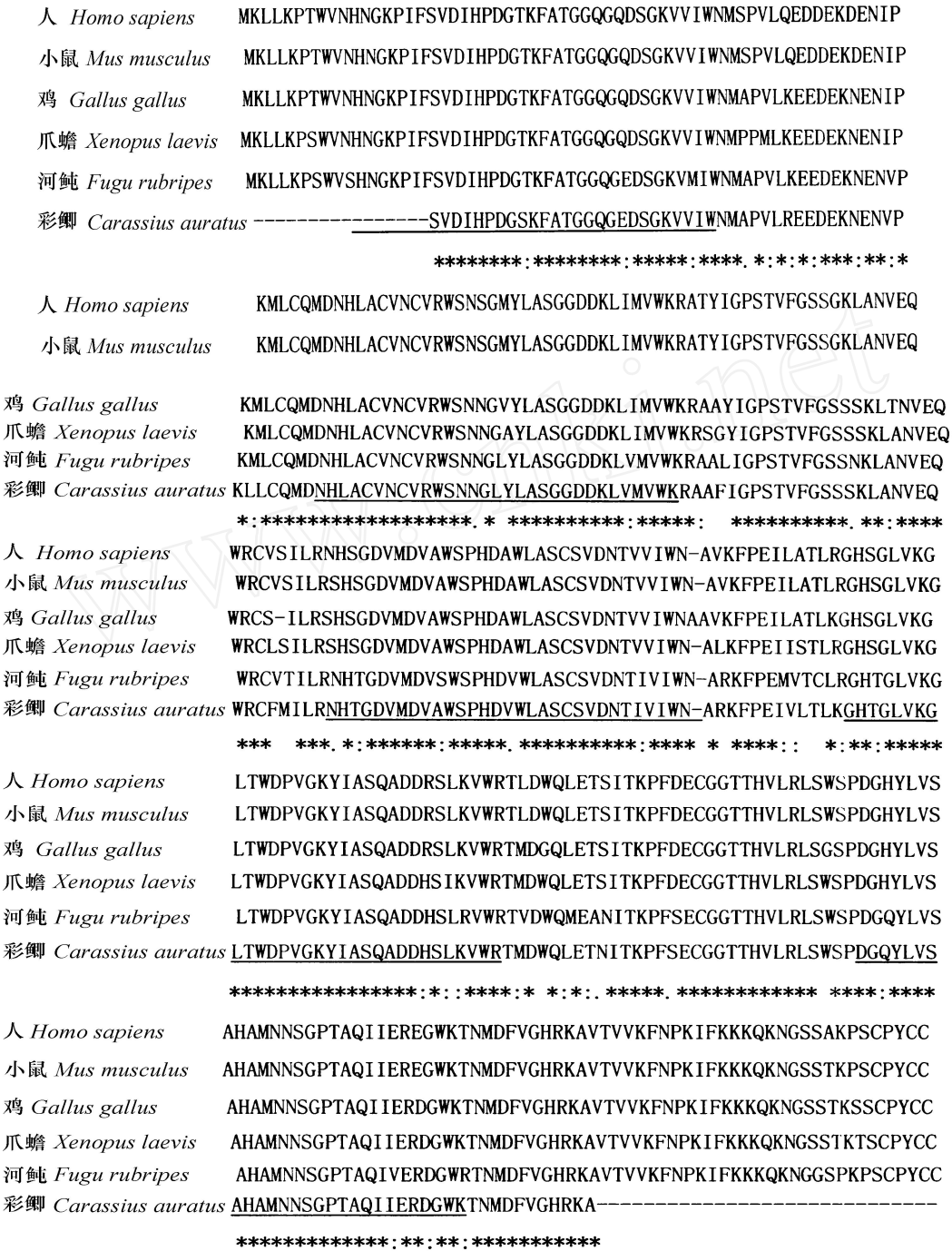


图2 彩鲫 *hira* 基因氨基酸序列与其他物种 *hira* 基因氨基酸序列的比较 (*表示相同氨基酸;:表示不同的氨基酸,下划线表示WD结构域)

Fig.2 Comparison of the derived amino acid sequences of the *Homo sapiens* (Accession No. X81844), *Mus musculus* (Accession No. X99712), *Gallus gallus* (Accession No. X99375), *Xenopus laevis* (Accession No. BC078007), *Fugu rubripes* (Accession No. U94324) and *Carassius auratus hira* gene (The alignment is performed by using Clustal W. The five WD domains are underlined, identical amino acids are marked by asterisks and distinct amino acids are indicated by double dots)

2.3 彩鲫 *hira* 基因组织表达的 RT-PCR 检测

根据所测序列设计一对特异引物,采用 RT-PCR

的方法检测了 *hira* 基因在彩鲫卵巢、脑、心、肝、脾、肾、肌、精巢各组织的表达情况,以 *actin* 的表达作为

内对照。结果表明,所检测的彩鲫组织除了精巢和肌肉中未检测到表达外,其余组织均表达。其中卵

巢和肝脏中表达很强,而在脑、心、脾、肾中表达较弱(图3)。

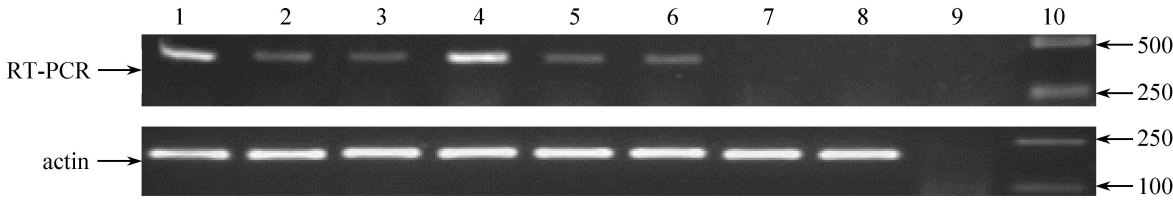


图3 彩鲫 *hira* 基因在组织中的表达(1:卵巢;2:脑;3:心;4:肝;5:脾;6:肾;7:肌肉;8:精巢;9:阴性对照;10:分子量标记)

Fig.3 Tissue expression of *hira* gene in color crucian carp *Carassius auratus* (1: Ovary;2: Brain; 3: Heart; 4: Liver; 5: Spleen; 6: Kidney; 7: Muscle; 8: Testis; 9: Negative control; 10: DL200Marker)

3 讨 论

HIRA 家族的 N 端在进化上比较保守,且能够和其他的组蛋白伴侣如:ASF-1(染色质组装和调节复合体成员)和 CAF-1(染色质组装因子 1)相互作用,对组蛋白基因的转录和异染色质的沉默起调节作用。HIRA 蛋白家族在 N 端的 7 个 WD 结构域(C 端以 WD(色氨酸-天冬氨酸)组成的二肽结尾,故名 WD 结构域),推测形成一个β螺旋结构和两个潜在的核定位信号区,该β螺旋结构与蛋白质-蛋白质互作有关^[6]。本研究从彩鲫卵巢中获得了 *hira* 基因近 N 端的 2181bp 基因片段和 759bp 的 cDNA 片段。同源性分析表明,彩鲫 *hira* 基因的外显子区域及编码的氨基酸序列与其他物种的 *hira* 基因具有高度同源性,进一步证明了 *hira* 基因在进化过程中的高度保守性。彩鲫 *hira* 基因氨基酸序列具有多个 WD 结构域,由于含有 WD 结构域的蛋白具有调节信号传递和 mRNA 前体加工的功能,可以推测彩鲫 HIRA 蛋白可能同样具有调节组蛋白基因表达的作用。

对不同发育阶段的果蝇提取 mRNA 进行 Northern 分析发现,在雌性成体中、未受精卵中和 0—3 时龄的胚胎中,杂交显示出很强的信号,之后杂交信号就变弱了,但在以后的发育阶段和雄性成体中都可以检测到。据此认为 HIRA 可能是母源性的,它们在早期胚胎发育过程中可能起了特别重要的作用^[2, 11]。最近的研究表明,在果蝇中 HIRA 可能在受精时精核的解凝和雄性原核的正常形成过程中起着重要作用^[15]。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^[5, 6]。我们的研究发现, *hira* 基因的转录本在彩鲫卵巢、脑、心、肝、脾、肾中均有表达,其中在卵巢和肝脏中表达很强,而在脑、心、脾、肾中表达较弱,在精巢、肌肉中

没有表达,说明其对维持肝脏和卵巢的功能方面可能有一定的作用,而对精巢和肌肉的发育没有影响。

Roberts 等对小鼠 *hira* 基因的定点突变研究发现,许多突变的胚胎发育成一个扭曲的原条。在所有的 *hira* 突变胚胎中,脊索没有得到正常发育,神经管的前后轴发育异常,大部分胚胎具有畸形的心脏回路,所有的胚胎都在发育至第 10d 或第 11d 时死亡,说明 *hira* 是鼠胚胎发生和存活的一个基本要素^[6]。 *hira* 基因在鱼类发育中的功能还没有报道。彩鲫 *hira* 基因片段的成功克隆和组织特异性表达分析为进一步研究 *hira* 基因在动物发育过程中的功能,特别为进一步研究 *hira* 基因与银鲫天然雌核发育生殖方式之间的关系提供了基础资料。

参考文献:

[1] Spector M S, Raff A, DeSilva H, et al. Hir1p and Hir2p function as transcriptional corepressors to regulate histone gene transcription in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17 (2): 545—552

[2] Kirov N, Shtilbans A, Rushlow C. Isolation and characterization of a new gene encoding a member of the HIRA family of proteins from *Drosophila melanogaster* [J]. *Gene*, 1998, 212 (2): 323—332

[3] Llevadot R, Estivill X, Scambler P, et al. Isolation and genomic characterization of the *TUHE1/ HIRA* gene of the pufferfish *Fugu rubripes* [J]. *Gene*, 1998, 208 (3): 279—283

[4] Ray-Gallet D, Quivy J P, Scamps C, et al. HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis [J]. *Mol Cell*, 2002, 9 (5): 1091—1100

[5] Roberts C, Daw S C, Halford S, et al. Cloning and developmental expression analysis of chick *Hira* (*Chira*), a candidate gene for Di-George syndrome [J]. *Hum Mol Genet*, 1997, 6 (2): 237—245

[6] Roberts C, Sutherland H F, Farmer H, et al. Targeted mutagenesis of the *Hira* gene results in gastrulation defects and patterning abnormalities of mesodermal derivatives prior to early embryonic lethality [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22 (7): 2318—2328

[7] Pizzuti A, Novelli G, Ratti A, et al. Isolation and characterization of

- a novel transcript embedded within HIRA, a gene deleted in DiGeorge syndrome [J]. *Mol Genet Metab*, 1999, **67**(3): 227—235
- [8] Sutton A, Bucaria J, Osley M A, *et al.* Yeast ASF1 protein is required for cell cycle regulation of histone gene transcription [J]. *Genetics*, 2001, **158**:587—596
- [9] Sharp J A, Fouts E T, Krawitz D C, *et al.* Yeast histone deposition protein ASF1p requires Hir proteins and PCNA for heterochromatic silencing [J]. *Curr Biol*, 2001, **11**:463—473
- [10] Sharp J A, Franco A A, Osley M A, *et al.* Chromatin assembly factor I and Hir proteins contribute to building functional kinetochores in *S. cerevisiae* [J]. *Genes Dev*, 2002, **16**(1): 85—100
- [11] Llevadot R, Marques G, Pritchard M, *et al.* Cloning, chromosome mapping and expression analysis of the *HIRA* gene from *Drosophila melanogaster* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **249**(2): 486—491
- [12] Wilming L G, Snoeren C A, van Rijswijk A, *et al.* The murine homologue of HIRA, a DiGeorge syndrome candidate gene, is expressed in embryonic structures affected in human CATCH22 patients [J]. *Hum Mol Genet*, 1997, **6**(2): 247—258
- [13] Loppin B, Docquier M, Bonneton F, *et al.* The maternal effect mutation *sesame* affects the formation of the male pronucleus in *Drosophila melanogaster* [J]. *Dev Biol*, 2000, **222**(2): 392—404
- [14] Loppin B, Berger F, Couble P. The *Drosophila* maternal gene *sesame* is required for sperm chromatin remodeling at fertilization [J]. *Chromosoma*, 2001, **110**(6): 430—440
- [15] Loppin B, Bonnefoy E, Anselme C, *et al.* The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus [J]. *Nature*, 2005, **437**(7063): 1386—1390
- [16] Li C J, Gui J F. Comparative studies on in vitro sperm decondensation and pronucleus formation in egg extracts between gynogenetic and bisexual fish [J]. *Cell Research*, 2003, **13**(3): 159—169

SEQUENCE CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF HIRA GENE IN COLOR CRUCIAN CARP *CARASSIUS AURATUS*

DU Xin-Zheng¹, WANG Yu-Feng¹ and GUI Jia-Fang²

(1. College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079; 2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract : *Hir/ hira* (histone regulation) genes were first identified in yeast *Saccharomyces cerevisiae* as negative regulators of histone gene expression. They represent a conserved protein family found in various organisms, including *Drosophila*, pufferfish, *Xenopus*, chicken, mouse and human. The HIRA complex in *D. melanogaster* fulfilled both protamine removal and replication-independent deposition of H3.3-H4 tetramers in the male nucleus after sperm entry, thus making the sperm decondensation and forming male pronucleus to participate in the formation of the diploid zygote. In order to further analyse the function of *hira* gene in fish development and in gynogenesis, we cloned a segment of *hira* gene from colored crucian carp *Carassius auratus* (named *Cahira*) which shows high sequence similarity with vertebrate *hira* genes. The incomplete genomic sequence of *Cahira* gene is 2181bp including 6 introns, and the introns length are 118bp, 275bp, 372bp, 84bp, 472bp and 86bp, respectively. Its opening reading-frame (ORF) is 759bp, and encodes a 253 amino acid peptide. The peptide derived from the gene sequence contains WD-repeat domains in their amino-terminus, which is consistent with the characteristic of HIRA proteins. RT-PCR analysis showed that higher level of *Cahira* mRNA could be detected in ovary and liver, while lower expression level were present in brain, heart, spleen and kidney. No transcripts were detected in testis and muscle. This indicates that *hira* gene may play a definitive role in ovary and liver in colored crucian carp. The cloning of HIRA homologue from this carp and its expression analysis may provide basic documents for further study on the role of *hira* gene in fishes.

Key words : *Carassius auratus*; *Hira* gene; Clone; Tissue expression