

刺参 PDRG 基因全长克隆及其夏眠期间在消化道中的表达特征

王天明^{1,2}, 杨红生¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要: 夏眠是刺参的重要生理特征; 夏眠期间, 刺参体重明显减轻, 器官萎缩、退化, 其中消化道退化明显。PDRG(p53 and DNA damage-regulated gene)是近年来研究发现与细胞凋亡具有密切联系的基因, 其表达可促进细胞凋亡。本研究利用 SMART RACE 技术克隆获得刺参 PDRG 基因的 cDNA 全长序列, 并以此为基础, 研究刺参夏眠期间 PDRG 基因表达与消化道退化的相关性。结果显示, 刺参 PDRG 基因 cDNA 全长为 1122bp, 包含 127bp 的 5'非翻译区(untranslated region, UTR), 581bp 的 3'UTR 和 414bp 的开放阅读框(open reading frame, ORF); ORF 区编码 137 个氨基酸, 推算的分子质量约为 16.1kDa, 理论等电点为 7.83。研究通过 25℃ 温度诱导刺参进入夏眠, 利用实时定量 PCR 方法, 定量检测刺参消化道 PDRG 基因表达, 结果表明: 夏眠期间刺参消化道 PDRG 基因 mRNA 表达水平与对照组相比出现显著上升, 实验 5d 时显著上调至约 2.49 倍, 10d 时显著上调至约 1.51 倍, 而在 0、20、40 d 时未检测出显著变化; 与刺参消化道相对质量变化数据结合分析表明, 刺参夏眠期间消化道的 PDRG 基因高表达与其萎缩、退化密切相关。本研究阐明刺参夏眠期间消化道组织退化过程中 PDRG 基因表达特征, 证明刺参 PDRG 基因表达与消化道退化具有相关性, 为进一步探讨 PDRG 基因在动物器官退化过程中的功能提供参考依据。

关键词: 刺参(*Apostichopus japonicus*); PDRG; 夏眠; 器官退化; 实时定量 PCR

中图分类号: S96; S917 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)12-0001-09

刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 属棘皮动物门(Echinodermata), 游走亚门(Eleutherozoa), 海参纲(Holothuroidea), 楯手目(Aspidochirota), 刺参科(Stichopodidae), 仿刺参属(*Apostichopus*), 是温带种类^[1]; 刺参分布于北纬 35°N 到 44°N 的西北太平洋沿岸, 北起俄罗斯的海参崴, 经日本海, 朝鲜半岛南部到我国黄、渤海, 苏鲁交界的海州湾的前三岛是该物种在我国自然分布的南界^[2-4]。近年来, 随着市场需求的不断扩大, 刺参已经是我国重要的水产养殖对象^[5]。刺参生活史中存在重要生活习性—夏眠, 当海水温度升高到一定范围后, 刺参停止摄食, 器官萎缩、退化, 体重明显减轻, 其中消化道退化极为明显, 夏眠期间退化为直径不到 1 mm、长度不到夏眠前一半的细线^[3, 6-7]。目前研究表明, 动物器官退化与细胞凋亡具有密切联系。在哺乳动物的肾脏、肾上腺皮质、前列腺和黄体等器官退化研究中, 均发现细胞凋亡与退化过程中的细胞剔除相关^[8-11]。夏眠刺参器官退化研究显示, 夏眠期间刺参消化道退化中肠壁组织明显变薄, 细胞数量显著减少, 与细胞凋亡具有

密切联系。

为研究刺参夏眠分子调控机理, 本实验室采用 454 高通量测序技术获得大量 EST 序列数据, 进行转录组水平的基因表达差异分析, 以查找相关功能基因并探索其调控过程。在数据库中, 检索获得具有 PDRG 基因注释的长为 270 bp 的 EST 序列。PDRG 基因是一个发现较晚的基因, 对其报道较少, 目前认为 PDRG 基因表达与细胞凋亡具有密切联系, 与 MDR1(multi-drug resistance gene)和 53BP2(p53 binding protein 2)等基因具有相似的调控: p53 蛋白对 PDRG 基因表达具有抑制作用, 而紫外光胁迫可诱导 PDRG 基因表达上升; 初步研究认为该基因的表达对细胞凋亡具有促进作用^[12]。然而, 有关动物器官退化过程中 PDRG 基因表达的研究尚未见报道。

收稿日期: 2013-02-11; 修回日期: 2013-06-24

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划项目(2006AA10A411); 山东省农业良种工程课题“速生抗病耐高温刺参良种选育”

作者简介: 王天明(1983-), 男, 博士研究生, 研究方向为海洋生物学, 电话: 15105805812; 杨红生, 通信作者, 研究员, 电话: 0532-82898-620, 13863959928, E-mail: hshyang@ms.qdio.ac.cn

本研究通过 SMART RACE 技术,首次克隆获得刺参 PDRG 基因全长 cDNA 序列;对推导获得的氨基酸序列进行同源比对和分子进化分析,初步确定该基因氨基酸序列的特性;利用实时定量 PCR 技术,检测分析温度诱导夏眠期间刺参消化道组织退化过程中 PDRG 基因表达变化。刺参 PDRG 基因的克隆及分析为进一步研究刺参 PDRG 基因结构和功能提供支持;刺参夏眠过程消化道组织 PDRG 基因表达分析,将为探讨动物 PDRG 基因在器官退化中的作用及揭示 PDRG 基因功能提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

实验用刺参于 2010 年 4 月取自青岛胶南刺参养殖池,该池刺参养殖期间不投饵,摄食天然饵料。捕捞刺参时,养殖池内水温为 12.23℃。刺参从池中取出后放入塑料袋,低温储运至实验室,暂养驯化 1 周。在暂养驯化期间,水温控制在 15±0.5℃范围,盐度为 32.53~34.61。暂养时每天按时定量投喂人工配合饲料(由马尾藻粉、鼠尾藻粉、海泥、细沙和海参配合饵料按等比例配合而成),定时换水和清理粪便及残饵,定期检查水温和刺参的情况。

实验主要采用试剂为:Trizol(Invitrogen)、M-MLV 逆转录酶(Promega)、GoTaq[®] Green Master Mix(Promega)、SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)、TIANgel Mini Gel Extraction Kit(Ti-angen)、pMD 18-T Vector(TaKaRa)、TOP10 感受态细胞(Ti-angen)、RQ1RNase-Free DNase(Promega)、RNase-Free RNase inhibitor(Promega)、SYBR Green Master Mix (TaKaRa)。

1.2 方 法

1.2.1 诱导刺参夏眠及样品采集

实验于 2010 年 4~5 月在中国科学院海洋研究所实验室内进行,实验海水为沉淀沙滤自然海水,用电加热棒控制水温,实验期间水温的日变化不超过 0.5℃,盐度为 32.53~34.61, pH 变动范围为 7.76~7.89。共设实验组(25℃)及对照组(15℃)两个温度处理,实验组温度从 15℃水温以 1.5℃/d 升温速度经过一周后达到预定温度,之后保持 25℃±0.5℃范围。实验期间,连续充气,每天换水 1/2。

自实验组水温升至预设温度时开始计时,分别于 0, 5, 10, 20, 40 d 等 5 个时间点取样,每组随机取 5

头刺参,记录湿质量后解剖取全肠,每个消化道样品去除内容物后分别称重并置入液氮中用陶瓷研钵磨成粉末,存入冻存管,-80℃保存用以基因表达定量研究。

1.2.2 刺参消化道组织总 RNA 提取

采用 TRIZOL 法提取总 RNA,操作如下:每个刺参消化道组织粉末样品取 30 mg 加入 1.5 mL 离心管中,加 1 mL Trizol,震荡混匀,裂解组织;加入 0.2 mL 氯仿,用力震荡 15 s,并于室温放置 5 min;12 000 g, 4℃,离心 15 min;离心后,混合物从上到下依次为无色的水相、中间相和淡红色的酚仿相, RNA 存在于水相中;小心吸取 300 μL 水相移至 Eppendorf 离心管中,加入等体积异丙醇,混匀后 -20℃ 放置 15 min;12 000 g, 4℃,离心 15 min,沉淀 RNA;去上清,加 1 mL 75%的乙醇洗涤 RNA 沉淀,12 000 g, 4℃,离心 10 min,弃上清,重复洗涤一次;将带有 RNA 沉淀的离心管置于干净处,干燥 5~10 min,加入 30 μL RNase-free 水,4℃,放置 30 min,充分溶解 RNA,获得总 RNA 样品;将总 RNA 样品用琼脂糖电泳检查 RNA 的完整性,以 28S 组分与 18S 组分的比率为参考,判断 RNA 样品降解程度;取少量 RNA 样品,稀释 100 倍使用 Thermo Scientific NanoDrop 1000 分光光度计检测计算总 RNA 样品浓度。

1.2.3 刺参 PDRG 基因克隆及全长测序

采用对照组刺参 RNA 样品为模板,按照 SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit User Manual (Clontech)说明分别合成 3'端及 5'端 RACE cDNA,用以全长克隆。

3'端扩增:以实验室采用 454 高通量测序技术获得大量的刺参 EST 数据为基础,筛选获得具有 PDRG 基因注释的长为 270bp 的 EST 序列,并根据获得的 EST 序列设计上游引物 Af: 5'-AGAGAGGCA ATTCGAGCTCTACAGAA-3',采用 SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)UPM 引物作为下游引物(混合引物: 5'-CTAATACGACTCACTATAG GGCAAGCAGTGGATCAACGCAGAGT-3'(long), 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'(short)),以 3'RA CE cDNA 为模板,按说明要求配制反应体系,扩增 3'片段,扩增程序为 94℃ 30s、68℃ 30s、72℃ 3 min, 30 个循环后 4℃保存备用。

5'端扩增:采用 Clontech 试剂盒 UPM 引物作为上游引物,根据获得的 EST 片段,设计下游引物 Ar: 5'-

TCCAGTTCTCTCAGTCGTGACACTTT-3', 以 5'RACE cDNA 为模板, 按说明要求配制反应体系, 扩增 5'片段, 扩增程序为 94°C30s、68°C30s、72°C3min, 30 个循环后 4°C 保存备用。

采用 1%琼脂糖凝胶电泳分离检测扩增产物, 切取合适片段区域, 用 TIANgel Mini Gel Extraction Kit 回收目的片段 PCR 产物。利用 pMD18-T 载体及 Top 10 感受态细胞, 连接转化回收片段, 挑取阳性克隆, 进行测序。

1.2.4 刺参 PDRG 基因同源性分析及分子进化分析

将获得的刺参 PDRG 基因全长 cDNA 序列与 GenBank NR 序列数据库作 BLAST 分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>); 应用 ORF Finder 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)确定正确的开放阅读框; 应用 ProtParam 程序(<http://expasy.org/tools/protparam.html>)预测氨基酸序列的物理参数; 应用 SMART 程序(<http://smart.embl-heidelberg.de>)预测蛋白基本结构及功能; 应用 ClustalW2 程序(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)对多物种 PDRG 氨基酸序列进行多序列比对和同源性分析; 利用 MEGA4.1 软件, 采用邻接法(NJ 法)构建 PDRG 基因分子进化系统树(Bootstrap 重复 1000 次计算各分支置信度)。

1.2.5 夏眠期间刺参消化道组织 PDRG 基因表达分析

采用 Oligo dT 引物反转总 RNA 合成样品 cDNA, 具体操作如下: DNA 消化: RNA 1~5 μ L(总量 1 000 ng)、RQ1RNase-Free DNase 1 μ L、RNase-Free RNase inhibitor 0.5 μ L、5 \times M-MLV Buffer 2 μ L、RNase-Free

water 调整总体积至 11.5 μ L、37°C 温浴 20 min, 在上述体系中加入 Stop solution 1.0 μ L, 65°C 10 min 灭活 DNase I; 预变性: 在以上体系中加入 Oligo dT 2.0 μ L 70°C 热变性 5 min, 迅速冰浴 2 min; 反转: 在已完成变性反应的以上体系中加入 5 \times M-MLV 反应缓冲液 3.0 μ L、无 RNase dNTP (10mmol/L each)1.25 μ L、M-MLV 反转录酶(200U)1.0 μ L、RNase E 抑制剂 0.5 μ L、RNase-Free water 调整总体积至 25 μ L, 轻微震荡混匀后低速离心。置入 PCR 仪 42°C 反转录 1 h, 95°C 10 min 灭活反转录酶, 取 2 μ L 溶液电泳检测其质量, 将获得的优质 cDNA 溶液-20°C 保存备用。

Real-time PCR 检测: 夏眠期间刺参消化道 PDRG 基因表达检测采用多内参基因(NDUFA13 和 ACTB), 引物序列见表 1。采用 SYBR Green Master Mix 试剂对样品进行基因定量检测, 反应体系为: cDNA 1.0 μ L、SYBR Green Master Mix 12.5 μ L、Forward primer 0.8 μ L、Reverse primer 0.8 μ L、RNase-Free water 9.9 μ L; 反应条件为: 95°C 预变性 5s, 40 个循环扩增(95°C 变性 10s、60°C 退火 20s、72°C 延伸 30s), 结束反应后, 溶解曲线分析产物单一性。用以实时定量 PCR 扩增的 PDRG 基因引物序列见表 1。

数据分析: 采用 Eppendorf 实时定量 PCR 仪自带软件(realplex software version 2.2)分析和收集数据, 获取各基因扩增曲线的 Ct 值, 采用多内参基因作为参照, 用几何平均数法处理多内参基因数据, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对目标基因定量结果进行分析^[13-14], 实验组与对照组差异采用统计软件(PASW Statistics 18.00)进行单因素方差分析, 显著性差异为 $P < 0.05$ 。

表 1 内参基因及 PDRG 基因及引物

Tab.1 The accession numbers and corresponding oligonucleotide primers of internal control and PDRG gene used in the experiment

基因名称	注册号	引物名	引物序列	产物长
NDUFA13	HQ292611	F1	GACATTCTGAAGCAACTGCAAC	170
		R1	AACATTGCCTCAATTCTGTTTCT	
ACTB	AB510191	F2	AAGGTTATGCTCTTCCTCACGCT	137
		R2	GATGTCACGGACGATTTACAG	
PDRG	JF815074	Fp	CAAATCAAAAAGGAGTGGGTGTG	148
		Rp	AGTCGTGACACTTTAGGTCTGAAG	

2 实验结果

2.1 刺参 PDRG 基因 cDNA 全长序列特征

拼接测序获得的 PDRG 基因 5'端及 3'端序列获得

全长 cDNA 序列, 推导获得其氨基酸序列。基因全长为 1122bp, 包含 127bp 的 5' UTR、581bp 的 3'UTR 和 414bp 的 ORF, 其中 ORF 区编码 137 个氨基酸(图 1)。其中 AATAAA 为推测的多聚腺苷酸加尾信号位点

```

1  acatgggtctgctcaatatgttcctca caagcatgtttacatgttac actgttcgaaaatcttaaac agattgtt agttgct agtgctacta
95  tcaaaatattaaattcgacttgaaaaggacaac
128  ATGTCTCGTGACACGCGGTTTCGTTTTGAATCATCTCACTGAATTGGAGGAGCTC
M S R D T R F V L N H L T E L E E L
182  GCTGAAGAGGTCTTAACTGTGAAAACAACAGATTGTGGATTGGACAAGAAGAGG
A E E V L T V K Q Q I V D L D K K R
236  AATCAAAACAGAGAGGCAATTCGAGCTCTACAGAACAAAAAGAAGAAAAACAACA
N Q N R E A I R A L Q N K K K K T T
290  CAAGAAGGGGATAAGAAAAACAATCAAAAAGGAGTGGGTGTGCTTTGGAAACACA
Q E G D K K T N Q K E W V C F G N T
344  TTTATGAAACTTCCTCAGTCAAAAACACAAGACATGCTTCAGGAAGATCAAAAC
F M K L P Q S K T Q D M L Q E D Q N
398  AGTCTCGATCAAGAAATTGATAAACTACACAATGAACTTCGACCTAAAGTGTC
S L D Q E I D K L H N E L R P K V S
452  CGACTGAGAGAACTGGAAGGTTTACCCGAAGCGAAAGGATTTGATCTGAAAAGT
R L R E L E G L P E A K G F D L K S
506  TTAACCAAGAAGAAGCCATGCCATTCACAGATGA
L T K E E A M A I H R *
542  cgaa catgctt actgtaac catgg caacagaa gtttaac aatgctgtcc agggaggatc cagatt cttgatg gtttagc aaatgctta atgtct
633  ggtgaaa cctttgat gata aatc caa cattc ccatg atac aatgatt ggttcctttg atcgtgg atga aaat agaag aact gctga catta
724  gagaa agtatc agtttga acttgt cagg acag atgc atgctc cttgc aaat aagatt aca aaa acta cat catagg aag aaga gcttttc
815  atttaa agtattt ggttggttt aa ataa gatg atcct aga aca ggtcgg cca ac cctg actg gca atgtatt cct cgc cac cttaa aga
906  aagga aggac ataa gtatg gta acttctt gtttag agtata aaga agatt atgctgct atca aaa caat gca attgaag agc acagtt
998  ttaattggtg taatcttc caa cacttt ggcat cga aac catgtg aataaaa tttt gaa atag cattgtg cact cac ctctg taca ctc aaaa
1091  aaaaaa aaaaaa aaaaa aaaaa aaaa aaagt
    
```

图 1 刺参 PDRG 编码基因 cDNA 全长及推导的氨基酸序列

Fig. 1 The full-length of cDNA and deduced amino acid sequence of PDRG from *A. japonicus*

小写字母代表 5'、3'端非翻译区；大写字母部分为编码区，且上面为核苷酸序列，下面为氨基酸序列；方框标出的是多聚腺苷酸加尾信号位点 AATAAA；*表示终止密码子

5', 3'untranslated regions are shown as lowercases; Coding region is shown as uppercases, the upper sequence indicates the nucleotides and the lower shows the amino acids; Putative polyadenylation signals (AATAAA) are boxed; * indicates the stop codon

(polyadenylation signal site)。

2.2 刺参 PDRG 氨基酸的序列特征

推导获得的 PDRG 蛋白序列共有 137 个氨基酸，分子式为 C₆₉₅H₁₁₅₁N₂₀₇O₂₂₁S₅，原子总量 2279，推算的分子质量约为 16.1ku，理论等电点为 7.83。氨基酸组成中含量最高为 Lys (K) 12.4%、Leu (L) 12.4% 及 Glu (E) 11.7%，带负电荷氨基酸(Asp + Glu)25 个，带正电荷氨基酸(Arg + Lys)26 个。推算出 PDRG 蛋白序列 9~65 及 87~114 氨基酸区域为复合螺旋区 (coiled coil regions)。

2.3 PDRG 多序列比对及进化树构建分析

应用 BlastP 检索刺参 PDRG 基因氨基酸序列，分别选取脊椎动物的哺乳动物、鸟类、两栖类、鱼类及无脊椎动物的尾索动物、节肢动物、线虫等物种的 PDRG 氨基酸序列，利用 ClustalW2 进行多序列比对分析，结果显示刺参与各物种 PDRG 基因氨基

酸序列相似度均较高，而且刺参 PDRG 氨基酸序列第 28~46 位的 QIVDLDKKRNQNREAIRAL 序列存在于序列保守区域，与多物种比对显示很高的同源性 (图 2)。

应用 MEGA4.1 软件，以邻接法(NJ 法)构建 PDRG 基因氨基酸序列的系统树(图 3)，采用 Bootstrap 重复 1000 次检验。在该系统进化树可分为两支，刺参与无脊椎动物聚在一起，且在无脊椎动物一支中与脊椎动物最接近，显示刺参 PDRG 基因的分子进化地位与刺参的生物学分类地位一致。

2.4 温度诱导夏眠实验期间刺参体重及消化道相对质量变化

25℃诱导刺参夏眠，对实验 0、5、10、20、40 d 采集刺参湿质量及消化道相对质量(消化道湿质量/刺参湿质量)进行统计，分析结果显示：实验组刺参

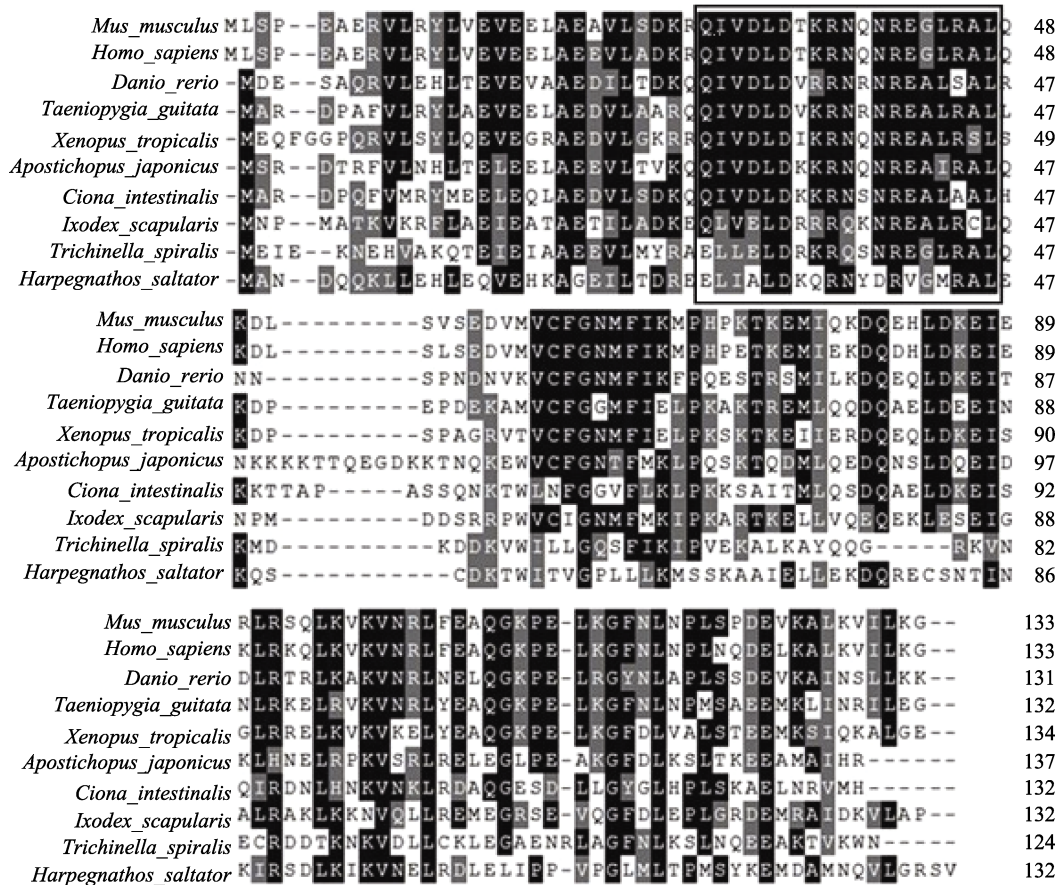


图 2 刺参 PDRG 氨基酸序列与其他多个物种的 PDRG 氨基酸序列的多序列比对结果

Fig. 2 Multiple sequence alignment analysis of PDRG amino acid sequences between *A. japonicus* and other species

相似性高于 60% 的用灰色背景和白色字体标出,一致性的氨基酸用黑色背景和白色字体标出。用来进行比对的序列包括: 小家鼠 *Mus musculus* 的 NP_849270.1、人 *Homo sapiens* 的 NP_110442.1、斑马鱼 *Danio rerio* 的 NP_001017757.1、斑胸草雀 *Taeniopygia guttata* 的 ACH44184.1、非洲负子蟾 *Xenopus (Silurana) tropicalis* 的 NP_001015688.1、玻璃海鞘 *Ciona intestinalis* 的 XP_002131860.1、肩突硬蜱 *Ixodes scapularis* 的 XP_002411634.1、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的 XP_970135.1、印度跳蚁 *Harpegnathos saltator* 的 EFN83689.1

Amino acid residues that are conserved in at least 60% sequences are shaded and similar amino acids are shaded in dark. The PDRG amino acid sequences are from: Mouse, *Mus musculus*, NP_849270.1; Human, *Homo sapiens*, NP_110442.1; Zebrafish, *Danio rerio*, NP_001017757.1; Zebra Finch, *Taeniopygia guttata*, ACH44184.1; Frog, *Xenopus (Silurana) tropicalis*, NP_001015688.1; Sea squirt, *Ciona intestinalis*, XP_002131860.1; Black-legged tick, *Ixodes scapularis*, XP_002411634.1; Red flour beetle, *Tribolium castaneum*, XP_970135.1; Indian Jumping Ant, *Harpegnathos saltator*, EFN83689.1

湿质量在第 10 天显著低于对照组, 20 d 之后差异极显著(图 4); 实验 5 d 至 20 d 期间, 实验组刺参消化道相对质量呈现快速下降, 在 5 d 时出现较明显的降低, 在 10 d 后出现极显著降低(图 5)。

2.5 温度诱导刺参夏眠期间消化道 PDRG 基因表达特征

25℃ 诱导刺参夏眠实验期间 0、5、10、20、40 d 所取消化道样品进行 PDRG 基因表达定量分析, 结果显示: 与对照组刺参样品相比, 实验组夏眠刺参消化道组织中 PDRG 基因表达在 5 d 显著上调至约 2.49 倍, 10 d 时显著上调至约 1.51 倍, 而在 0、20、40 d 时未检测出显著变化(图 6)。

3 讨论

3.1 刺参 PDRG 基因推导氨基酸序列特征及结构分析

目前关于动物 PDRG 基因的研究比较少, Luo 等^[12]对人和鼠的 PDRG 基因进行了系统分析, 两个氨基酸序列同源性高, 且未发现与之相似的其他基因种类; 推测人 PDRG 氨基酸序列长度均为 133aa, 分子质量分别为 15.5 和 15.3 ku。本研究获得的刺参 PDRG 基因氨基酸序列长度较人和鼠长, 为 137aa, 分子质量也较大, 为 16.1 ku。氨基酸多序列比对结果显示, 相比其他物种, 刺参 PDRG 氨基酸序列的 50~60aa

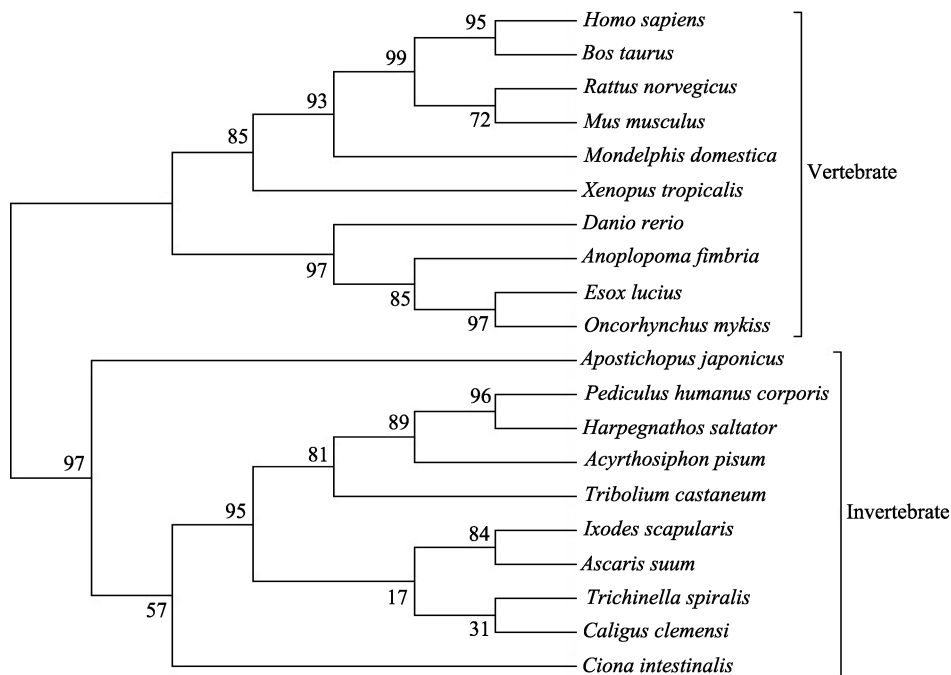


图 3 使用 NJ 法构建的 PDRG 氨基酸序列系统进化树

Fig.3 The NJ phylogenetic tree of PDRG amino acid sequences of species

用来构建进化树的序列包括: 人 *Homo sapiens* 的 NP_110442.1、牛 *Bos taurus* 的 NP_001071583.1、褐家鼠 *Rattus norvegicus* 的 NP_001014762.1、小家鼠 *Mus musculus* 的 NP_849270.1、短尾负鼠 *Monodelphis domestica* 的 XP_001362684.1、非洲负子蟾 *Xenopus (Silurana) tropicalis* 的 NP_001015688.1、斑马鱼 *Danio rerio* 的 NP_001017757.1、裸盖鱼 *Anoplopoma fimbria* 的 ACQ58385.1、白斑狗鱼 *Esox lucius* 的 ACO13915.1、虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* 的 NP_001154150.1、人体虱 *Pediculus humanus corporis* 的 XP_002428248.1、印度跳蚁 *Harpegnathos saltator* 的 EFN83689.1、豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 的 XP_001950519.2、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的 XP_970135.1、肩突硬蜱 *Ixodes scapularis* 的 XP_002411634.1、蛔虫 *Ascaris suum* 的 ADY47649.1、旋毛虫 *Trichinella spiralis* 的 EFV57563.1、鱼虱 *Caligus clemensi* 的 ACO14741.1、玻璃海鞘 *Ciona intestinalis* 的 XP_002131860.1

The PDRG amino acid sequences are from: Human, *Homo sapiens*, NP_110442.1; Feral cattle, *Bos taurus*, NP_001071583.1; Rat, *Rattus norvegicus*, NP_001014762.1; Mouse, *Mus musculus*, NP_849270.1; Gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*, XP_001362684.1; Frog, *Xenopus (Silurana) tropicalis*, NP_001015688.1; Zebrafish, *Danio rerio*, NP_001017757.1; Sablefish, *Anoplopoma fimbria*, ACQ58385.1; Northern pike, *Esox lucius*, ACO13915.1; Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, NP_001154150.1; Body louse, *Pediculus humanus corporis*, XP_002428248.1; Indian Jumping Ant, *Harpegnathos saltator*, EFN83689.1; Pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, XP_001950519.2; Red flour beetle, *Tribolium castaneum*, XP_970135.1; Black-legged tick, *Ixodes scapularis*, XP_002411634.1; Intestinal roundworm, *Ascaris suum*, ADY47649.1; Trichina, *Trichinella spiralis*, EFV57563.1; Sea louse, *Caligus clemensi*, ACO14741.1; Sea squirt, *Ciona intestinalis*, XP_002131860.1

位置出现一段较新的序列, 该序列的出现在刺参 PDRG 前段复合折叠区, 其功能影响将有待进一步研究揭示; 刺参 PDRG 氨基酸序列在末端缺少约 4 个氨基酸残基, 而在人 PDRG 氨基酸序列中, C 末端形成 α 螺旋-转角- α 螺旋基元(helix-turn-helix motif), 该结构可能与蛋白-蛋白及蛋白-DNA 互作有关^[12], 刺参 PDRG 氨基酸的末端功能是否受该变异的影响仍需进一步研究揭示。综合分析刺参 PDRG 氨基酸序列及结构结果显示, 与多物种序列同源性高, 具有同源性极高的保守序列 QIVDLDKKRNRQ-NRE-AIRAL, 且分子进化树分析与刺参生物学分类地位一致, 可理论推导确定研究获得的 cDNA 全长序列为 PDRG 基因。

3.2 温度诱导夏眠实验期间刺参体重变化及消化道退化特征

温度是刺参夏眠的重要诱导因素^[4, 7, 15], 有研究表明, 不同体重刺参夏眠阈值温度不同, 体重 25 g 以内的幼参不夏眠; 25~85 g(1 龄)、86~160 g(2 龄)和 160g 以上(2~3 龄)夏眠的界温度分别为 24.1℃、22.9℃和 21.8℃^[7]。本研究采用 25℃温度诱导刺参夏眠, 与 28℃温度诱导夏眠实验期间生理指标变化特征相似^[16]。实验期间, 刺参湿质量出现下降, 实验组刺参湿质量在第 10 天显著低于对照组, 20 d 之后差异极显著; 实验 5 d 至 20 d 期间, 实验组刺参消化道相对质量呈现快速下降, 在 5 d 时出现较明显的降低, 在 10 d 后出现极显著降低。结果表明 25℃温度诱导

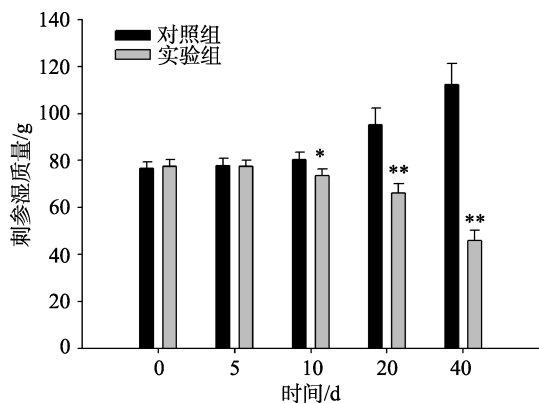


图 4 温度诱导夏眠实验期间刺参湿质量变化

Fig.4 Variation of the sea cucumbers' body weights during aestivation experiment

实验组与对照组之间差异性表示：“*”表示差异显著($P<0.05$), “**”表示差异极显著($P<0.001$); 数值表示为均值±标准误, 样品量为 5

“*” indicates significant differences ($P<0.05$) and “**” indicates extremely significant differences ($P<0.001$) between control and experimental groups. Values indicate the mean±SD ($n=5$)

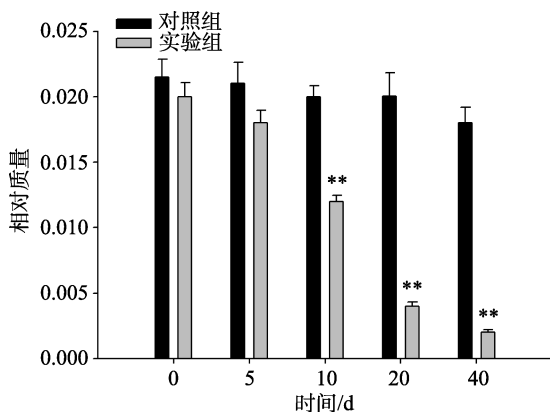


图 5 温度诱导刺参夏眠实验期间刺参消化道相对质量变化
Fig. 5 Variation of the sea cucumbers' related intestinal weights during aestivation experiment

“**”表示实验组与对照组之间差异极显著($P<0.001$); 数值表示为均值±标准误, 样品量为 5

“***” indicates extremely significant differences ($P<0.001$) between control and experimental groups; Values indicate the mean±SD ($n=5$)

刺参进入夏眠, 在实验 5 d 至 20 d 期间消化道组织处于退化萎缩过程。

3.3 刺参夏眠期间消化道 PDRG 基因表达特征

人 PDRG 基因体外研究中发现, 紫外光可诱导 PDRG 基因表达上调, 并认为该基因的表达促进了紫外诱导细胞凋亡^[12]。本研究以克隆获得的 PDRG 基因全长为基础, 采用实时定量 PCR 技术, 以夏眠期间表达稳定的看家基因(NDUFA13、ACTB)为多内

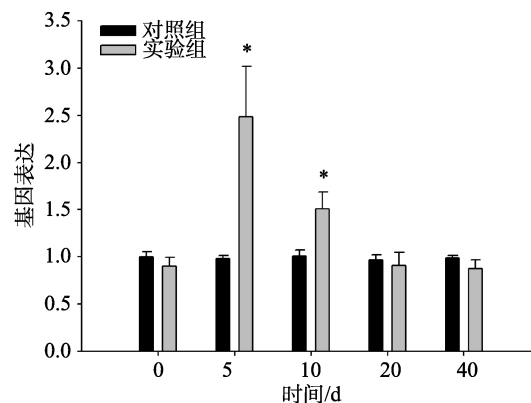


图 6 刺参夏眠期间消化道 PDRG 基因表达变化

Fig. 6 Variation of PDRG expression in different phases of aestivating *A. japonicus* during aestivation experiment

采用实时定量 PCR 定量检测, 表达量经多内参基因 NDUFA13 及 ACTB 几何平均值进行均一化处理, “*”表示实验组与对照组之间差异显著($P<0.05$); 数值表示为均值±标准误, 样品量为 5

The mRNA expression levels relative to geometric averaging of NDUFA13 and ACTB mRNA levels were measured using real-time PCR. “*” indicates significant differences ($P<0.05$) among mRNA levels within genes. Values indicate the mean±SD ($n=5$)

参, 分析刺参夏眠期间消化道组织中的表达特征, 结果显示实验组夏眠刺参消化道组织中 PDRG 基因表达在 5 d 显著上调至约 2.49 倍, 10d 时显著上调至约 1.51 倍, 在 0、20、40d 时未检测到显著变化; 在刺参夏眠期间消化道退化过程细胞凋亡研究中发现, 刺参肠壁细胞在诱导夏眠实验期间第 5 d 和 10 d 时出现明显凋亡现象, 而在第 0 d 尚未出现凋亡, 第 20 d 及第 40 d 凋亡过程已经结束。综合分析结果表明: 在刺参诱导夏眠实验期间, 肠壁细胞出现明显凋亡的第 5 d 及第 10 d 时, PDRG 出现显著上调, 而在凋亡尚未发生的第 0 d 及凋亡过程结束的第 20 d 及第 40 d 时表达量未发生显著调整。实验初步证实刺参 PDRG 基因表达与消化道退化具有相关性, 可能与细胞凋亡调控有关。

综上所述, 氨基酸序列分析显示克隆获得的全长 cDNA 序列为刺参 PDRG 基因; 25℃ 诱导刺参进入夏眠状态, 夏眠期间消化道组织明显退化, PDRG 基因表达出现上调, 初步确定刺参夏眠期间 PDRG 基因的高表达与消化道退化具有相关性。鉴于目前关于 PDRG 基因参与细胞凋亡过程调控机理研究报道较为有限, 刺参夏眠期间消化道 PDRG 基因高表达对组织退化过程调控作用及机理仍需要进一步研究。

参考文献:

[1] Liao Y L. The Aspodochirote Holothurians of China

- with erection of a new genus [C]//Jangoux M. Echinoderms: Present and Past. Rotterdam: A A Balkema Publishers, Rotterdam,1980: 115-120.
- [2] 廖玉麟. 中国楯手目海参的研究[C]//中国科学院海洋研究所. 海洋科学集刊, 北京: 科学出版社, 1984: 221-247 .
- [3] Sloan N A. Echinoderm fisheries of the world: A review [C]//Keegan B F, O'Connor B D S. Echinodermata Rotterdam, A A Balkema Publishers, 1984: 109-124.
- [4] 隋锡林. 海参增殖养殖[M] . 北京: 农业出版社, 1988:15-59 .
- [5] Chen J X. Present status and prospects of sea cucumber industry in China [C]// Lovatelli A, Conand C, Purcell S, et al. Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management, Rome: FAO, 2004: 25-38.
- [6] 李馥馨, 刘永宏, 宋本祥, 等 . 海参(*Apostichopus japonicus* Selenka)夏眠习性研究 II 夏眠致因的探讨 [J] . 中国水产科学, 1996, 3(2): 49-57.
- [7] 刘永宏, 李馥馨, 宋本祥, 等 . 刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)夏眠习性研究 夏眠生态特点的研究[J] . 中国水产科学, 1996, 3(2): 41-48.
- [8] Leddacolumbano G M, Columbano A, Coni P, et al. Cell Deletion by Apoptosis during Regression of Renal Hyperplasia [J]. American Journal of Pathology, 1989, 135: 657-662.
- [9] Kerr J F R, Searle J. Deletion of cells by apoptosis during castration-Induced involution of rat prostate [J]. Virchows Arch, 1973. 13: 87-102.
- [10] Wyllie A H, Kerr J F R, Currie A R. Cell-Death in normal neonatal rat Adrenal-Cortex [J]. Journal of Pathology, 1973, 111: 255-261.
- [11] Azmi T I, Oshea J D. Mechanism of deletion of Endothelial-Cells during regression of the Corpus-Luteum [J]. Laboratory Investigation, 1984, 51: 206-217.
- [12] Luo X Q, Huang Y, Sheikh M S. Cloning and characterization of a novel gene PDRG that is differentially regulated by p53 and ultraviolet radiation [J]. Oncogene, 2003, 22(46): 7247-7257.
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [14] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. Genome Biology, 2002, 3(7): 254-259.
- [15] Yang H S, Yuan X T, Zhou Y, et al. Effects of body size and water temperature on food consumption and growth in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) with special reference to aestivation [J]. Aquaculture Research, 2005, 36: 1085-1092.
- [16] Gao F, Yang H S, Xu Q, et al. Effect of water temperature on digestive enzyme activity and gut mass in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka), with special reference to aestivation [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2009, 27(4): 714-722.

Cloning and characterization of PDRG gene from sea cucumber *Apostichopus japonicus* and the expression in intestine during aestivation

WANG Tian-ming^{1, 2}, YANG Hong-sheng¹

(1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Feb., 11, 2013

Key words: *Apostichopus japonicus* (Selenka); PDRG; aestivation; tissue regression; Real-time PCR

Abstract: Sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) undergoes an inactive phase “aestivation” as an important survival strategy in high-temperature environments. During aestivation, the tissue of *A. japonicus* especially the intestine was degenerated. PDRG (p53 and DNA damage-regulated gene) was a novel gene which was found to facilitate the UV-induced cell killing and be involved in apoptosis. To investigate the gene expression of PDRG and its function in tissue regression during the aestivation of *A. japonicus*, the PDRG was cloned, characterized and quantified in this study. The full-length cDNA sequence (1122bp) of PDRG gene from *A. japonicus* was cloned by SMART RACE. It consists of a 127 bp 5' UTR (untranslated region), a 581 bp 3' TUR and a 414 bp ORF (open reading frame). The deduced protein is composed of 127 amino acids with a molecular weight of 16.1 kDa, and its isoelectric point is 7.83. Sea cucumbers were induced to aestivation at temperature of 25°C to investigate the transcriptional variation of PDRG during the intestine regression of aestivating *A. japonicus*. The intestines were sampled, at 0, 5, 10, 20 and 40 d after the temperature reached 25°C, and then analyzed using real-time PCR for PDRG gene quantification. During the thermal inducing aestivation experiment, the mRNA level of PDRG was increased to 2.49 fold at 5 d sampling time and 1.51 fold at 10 d compared to the control. No significant variation of PDRG expression was observed at other sampling during the experiment. It was shown that the increase of PDRG gene expression was closely associated with the regression of intestine during aestivating of *A. japonicus*. In summary, the results of this study indicate that the PDRG has potential function in facilitating tissue regression during aestivation, which has provided a reference to explore the function of PDRG gene in animal organs degeneration.

(本文编辑: 梁德海)