

泥鳅二倍体与四倍体 *trim63a* 基因的 克隆及表达分析

宋晓然 詹凡玢 王卫民

华中农业大学水产学院/农业农村部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070

摘要 试验以泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*, *Ma*)为研究对象,采用PCR技术克隆获得 *trim63a* 基因(tripartite motif containing 63,又名肌肉环状指基因1)的cDNA部分序列,生物信息学分析结果显示,*Ma-trim63a* 基因cDNA的编码序列(coding sequence, CDs)为1 035 bp,编码344个氨基酸,与硬骨鱼类相似度较高。采用荧光定量PCR技术检测人工繁殖获得的二倍体(D×D)和四倍体(T×T)胚胎不同发育时期 *Ma-trim63a* 的表达量以及泥鳅二倍体(D)和四倍体(T)成鱼不同组织中 *Ma-trim63a* 的表达量,基因表达分析结果显示,*Ma-trim63a* 在泥鳅二倍体和四倍体成鱼肌肉中的相对表达量最高,其次是心脏;*Ma-trim63a* 在泥鳅二倍体和四倍体胚胎的13个发育时期均有表达,但是不同倍性的胚胎表达差异较大。

关键词 泥鳅; *trim63a* 基因; 多倍体; 肌肉分解代谢; 克隆; 表达分析

中图分类号 Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)05-0017-09

肌肉生长取决于蛋白质的合成和降解之间的平衡,目前已经研究得知肌肉蛋白质降解有4种途径:溶酶体途径、钙依赖性的蛋白酶途径、caspase途径和泛素蛋白酶体途径(UPS)。在哺乳动物中,大多数肌肉蛋白质通过UPS降解^[1-2],UPS是机体调节细胞内蛋白功能的重要机制,该过程需要泛素蛋白连接酶(E3)特异性地识别底物蛋白^[3],而肌肉环状指基因1(muscle RING finger 1, *MuRF1*),也称为 *TRIM63*(tripartite motif containing 63),*TRIM63*是与肌肉蛋白质分解代谢过程关系最为密切的E3^[4]。

TRIM 家族由4个基因(*TRIM63*、*TRIM55*和*TRIM54*)组成^[5],均在心肌和骨骼肌中表达,被称为“RBCC”蛋白质^[6]或“*TRIM*”蛋白质^[7],特征是均具有RING-fingers、B-box和卷曲螺旋结构域,其中RING-fingers结构域与泛素连接酶的活性相关^[8]。*TRIM63*是*TRIM*家族成员之一,目前已经有很多研究显示其能够通过UPS参与肌肉分解代谢过程,并在肌肉新生过程中起重要作用^[9]。对于*TRIM63*表达研究主要集中在哺乳动物中,主要在骨骼肌和心肌等横纹肌中特异性表达^[10],有功能研

究显示,*TRIM63*在维持肌原纤维的结构和蛋白质周转及控制肌肉质量方面发挥重要作用,*TRIM63*蛋白可以结合肌节蛋白titin激酶位点,维持肌节M线和粗肌丝完整性^[11],通过使心肌肌钙蛋白I泛素化并发生蛋白酶体依赖性的降解,参与蛋白质周转^[3,12]。但是目前此基因在鱼类中的研究较少,仅在斑马鱼(*Danio rerio*)^[13-14]、鲃(*Girella laevis*)^[15]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[16]和虹鳟(*Rainbow trout*)^[17]等克隆得到了*trim63* cDNA部分和全长基因序列,其中斑马鱼有2个高度同源的*trim63*基因(*trim63a*和*trim63b*),大西洋鲑有3个高度同源的*trim63*基因(*trim63a*、*trim63b*和*trim63c*),但关于其功能方面的研究较少,并且目前未见关于泥鳅*trim63*基因的研究。

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)是我国重要的小型淡水经济鱼类,具有成活率高、食性杂、生长速度快、繁殖能力强的特点,其肉质鲜美,营养丰富,有“水中人参”的美誉。在多倍体鱼类的研究中发现,多倍体鱼类比二倍体鱼类体型更大,生长速度更快,且生态适应性能力更强^[18],泥鳅中也存在多倍体的现象,其倍性组成较为复杂,主要由二倍体和

收稿日期: 2019-04-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372180)

宋晓然,硕士研究生,研究方向: 鱼类遗传育种与繁育。E-mail: xiaoransong@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 王卫民,博士,教授,研究方向: 鱼类遗传与育种。E-mail: wangwm@mail.hzau.edu.cn

四倍体组成^[19-22],天然泥鳅四倍体表现出较二倍体更好的生长性能^[23]。鱼类肌肉组织的生长发育过程是由相关功能基因的表达及调节因子共同调控的^[24],因此,研究肌肉分解代谢相关基因在多倍体鱼类中的时空表达及其内在联系,对于促进养殖鱼类快速生长,提高养殖生产效益具有重要意义。

本研究使用克隆技术获得泥鳅 *Ma-trim63a* 基因的 CDs 全长序列,采用荧光定量 PCR 技术对泥鳅二倍体、四倍体成鱼 7 种组织和泥鳅二倍体、四倍体胚胎 13 个发育时期的 *Ma-trim63a* mRNA 的表达进行了分析,旨在为研究泥鳅 *Ma-trim63a* 调控肌肉分解代谢的分子机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用泥鳅均购自武汉市白沙洲农副产品大市场,流式细胞仪(CyFlow Space, Sysmex Partec, 德国)鉴定倍性后于实验室暂养,水温为(25±1)℃,随机取泥鳅二倍体和四倍体成鱼各 3 尾,体质量为 9.97~13.10 g,体长为 10.452~12.260 cm,解剖后迅速取心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑、鳃和肌肉 7 个组织置于液氮中,之后保存于-80℃冰箱。通过人工授精的方法,分别获得泥鳅二倍体、四倍体胚胎,取受精卵、4~8 细胞期、多细胞期、囊胚期、原肠期、神经胚期、肌节出现期、尾鳍出现期、晶体出现期、肌肉

效应期、心跳期和出膜期 13 个时期样品,每时期平行取样 3 次,采集时用 PBS 冲洗干净,液氮速冻后存于-80℃冰箱。

1.2 *Ma-trim63a* 基因克隆

取泥鳅二倍体和四倍体肌肉,采用 Trizol 法提取总 RNA, Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, 美国)检测浓度和质量,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测完整性,取 1 μg 总 RNA 样品按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa, 日本)说明书反转录成 cDNA, 于-80℃冰箱保存备用。

从 NCBI 数据库中下载斑马鱼(*Danio rerio*)的 *trim63a* 基因序列,与笔者所在实验室泥鳅二倍体转录组数据库(<https://www.nature.com/articles/s41598-018-29991-6>)通过生物信息学比较分析,设计引物(表 1),引物由天一辉远生物科技有限公司合成。按照 TaKaRa LA Taq (TaKaRa, 日本)说明书进行 PCR 扩增,反应程序如下:94℃ 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测;目的片段按照 OMEGA Gel Extraction Kit (OMEGA, 美国)说明书进行胶回收;连接 pMD-18T 载体 (TaKaRa, 日本),转化到感受态细胞 *E.coli* DH5α (全式金, 北京)中进行克隆,PCR 检测后将阳性克隆送天一辉远生物科技有限公司进行测序。

表 1 泥鳅 *Ma-trim63a* 克隆和荧光定量 PCR 引物
Table 1 Primers used for cloning and qPCR of *Ma-trim63a*

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
<i>trim63a</i>	trim63a-F	CAGAAATGGACATTAACACGGGT	PCR
<i>trim63a</i>	trim63a-R	TTATTCCTCTTCCTCCTCCTCTTCT	PCR
<i>trim63a</i>	trim63a-QF	CAGAAATGGACATTAACACGGGT	qPCR
<i>trim63a</i>	trim63a-QR	GGAAGATACCTCCGGAATAGTGG	qPCR
<i>β-actin</i>	<i>β-actin</i> -F	GAACTCTTGCCACCATACCTG	qPCR
<i>β-actin</i>	<i>β-actin</i> -R	CCCAAGTCAATGCGTCAGAG	qPCR

1.3 *Ma-trim63a* 基因序列分析

将测得的序列在 NCBI 上作 Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对,ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 验证 *Ma-trim63a* 基因 CDs 序列的正确性;DNAMAN 软件推测编码的氨基酸序列;Expasy Protparam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析编码的蛋白质理化性质;TMHMM([http://www.cbs.dtu.](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)

[dk/services/TMHMM/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)) 分析蛋白质跨膜结构;Signal P 4.1 server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 分析信号肽;NetPhos 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 分析氨基酸磷酸化位点;NetOGlyc 4.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) 分析糖基化位点;SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白质二级结构;SWISS-MODEL (

swissmodel.expasy.org) 预测蛋白质三级结构。采用 MEGA 7.0 的 Neighbor-Joining (NJ) 分析法, 对 11 种脊椎动物 TRIM63 的氨基酸序列进行比对, 并构建系统进化树。

1.4 Ma-trim63a 基因表达分析

采用 Trizol 法提取泥鳅二倍体和四倍体成鱼 7 个组织的总 RNA 及二倍体和四倍体 13 个发育时期胚胎的总 RNA, 并逆转录成 cDNA, 设计特异性引物 trim63a-QF 和 trim63a-QR (表 1), 以 β -actin 基因的表达量作为内参。使用 ABI QuantStudio™ 6 flex 荧光定量 PCR 仪 (Thermo Scientific, 美国) 检测 Ma-trim63a 在泥鳅二倍体和四倍体成鱼不同组织及二倍体和四倍体不同发育时期胚胎中的表达, 按照 SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) (TaKaRa, 日本) 说明书操作, 每个样品设置 3 个平行, PCR 反应程序: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 58 °C 1 min, 72 °C 30 s, 40 个循环; 95 °C 15 s。运用 2^{-ΔΔCt} 方法分析 Ma-trim63a 表达水平, SPSS 19.0 进行数据统计分析, 显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 Ma-trim63a 基因 CDs 序列分析

通过克隆及测序结果对比显示, 泥鳅二倍体和四倍体 Ma-trim63a 基因 CDs 序列完全一致, 全长 1 035 bp, 编码 344 个氨基酸 (aa) (图 1), Expasy Protparam 结果显示 Ma-trim63a 编码的蛋白质为亲水性蛋白, 推测蛋白分子式为 C₁₆₉₆ H₂₇₂₄ N₄₅₂ O₅₅₈ S₂₈, 分子质量为 39.27 ku, 等电点为 4.70, 谷氨酸 (Glu) 含量最高为 12.2%, 组氨酸 (His) 含量最低为 2.0%, 带负电荷的残基 (Asp + Glu) 总数为 64, 带正电荷的残基 (Arg + Lys) 总数为 38; TMHMM 结果显示该蛋白质无跨膜区; Signal P 4.1 server 结果显示该蛋白质无信号肽; NetPhos 3.1 结果显示该蛋白质包含 15 个丝氨酸磷酸化位点、8 个苏氨酸磷酸化位点和 4 个酪氨酸磷酸化位点; NetOGlyc 4.0 Server 结果显示该蛋白质存在 6 个 O-糖基化位点; SMART 结果显示该蛋白质含有 4 个功能域即 RING fingers (24~71 aa)、B-box (117~159 aa) 和 2 个卷曲螺旋结构 (215~238 aa 和 329~344 aa) (图 2); SWISS-MODEL 预测该蛋白质三级结构如图 3 所示。

```
1 ATGGACATTAAACGGGTCAAATAGTACGTGCACCGAGCCCATGGAGGCTAGAGAG
1 M D I N T G Q I V R A P S P M E S L E K
61 CAGCTCAGCTGCCCATCTGCTGGAGATGTTACAAAGCCGGTGTCTATTCTGCCATGC
21 Q L S C P I F R C L E M F T K F V V I L D P C
121 CAACACAACCTGTGCCGAGGTGTGCCATGATCTCTACGACTCCAAAAACCCCTACAC
41 Q H N L C R R C A N D L Y D S K N P Y H
181 TATTCGGAGGTATCTTCGCTGCCAACCTGTGCTTTGAGGTGGTGTGGACCGCCAC
61 Y S G G I F R C P T R F E V V L D R H
241 GGCCTCTACGGTCTGCAGAGGAACCTTCTGTGTGAGAACATCATTGACATCTACAAGAA
81 G V Y G L Q R N L L V E N I I D I Y K E
301 CAGTTGGAGAAAGTAAATTCCTTGAACCCCTCTGAATCAAAAGACACAAAAGAACCA
101 Q L E K G N S L E F F L K S K D T K E F
361 ATGTGCGAGGTACAGAGATGAAAAATAAACATCTACTCATGACCTGCCAGACACCA
121 M C E V H E D E K I N I Y C M T C Q T P
421 ACATGCTCCATGTGCAAGTATTGCTCAGCACAAGACTGTGAAGTGTCCACATTGAAA
141 T C S M C K V F G Q H K D C E V S T L K
481 GTCGTTACGAAGCCAGACTCAGAGCTCAAAATTCATTAATGAACCTGTGGCGCTAGC
161 V V Y E G Q K S E L N S I E L L G A S
541 AATAGCTGCCTGCAGGCACTGTAACTCAGATGGAGAAATGGGCAAACTGTGGAAGAA
181 N S C L Q A L L T Q M E K M G K T V E E
601 AACAGCCAATGCAGAGCAAAAGCTAATGGAGAAAGTTGACCTGCTTTATGCTATCTTA
201 N S Q L Q K Q K L M E K F D L L Y A I L
661 GAGGAGCGCAAGTCCCACTCTAGATCAATACGCCAAGAACAGGACGAGAAAGTGGTG
221 E E R K S Q L L D Q I S Q E Q D E K V V
721 GTAGTGCATCTCTTGTCCAGCAGTACAATGAGCAGCTACAGGCCAGCATTAACTGATG
241 V V Q S L V Q Q Y N E Q L Q A S I K L M
781 GACAAAGCCACCCAGACCAACAGCAGTGTGGCGGAGTTTCTCATGCTGCCAAA
261 D K A T Q C T M D N S S V A E F L I A A K
841 AAGCTCATCACAGAAGCCAAAGACGCATCCAAGAGCTCCCATCTCCAGCGGCTGAGCCT
281 K L I T E A K D A S K S S H L Q R P E P
901 GGCCTTGAGAATATGACCATTTAAACAGTCTTTACTGATGATGTGGAGGCCATGCTTGA
301 G F E N M D H L T V F T D D V E A M L A
961 AAAATGGACTTTGGGTGGGTAAAGATGAAGATGATGATGAAGAAGAAGAAGAGGAG
321 K M D F G V G K D E D D D E E E E E E E
1021 GAGGAAGAGGAATAA
341 E E E E *
```

方框标出的是起始密码子; * 表示终止密码子。Start codon is indicated with square; termination codon is indicated with asterisks “*”.

图 1 Ma-trim63a 基因 CDs 序列及氨基酸序列
Fig.1 The CDs and deduced amino acid sequence of Ma-trim63a

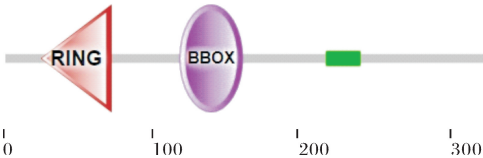


图 2 Ma-Trim63a 蛋白的预测结构域
Fig.2 The prediction of Ma-Trim63a protein domain



图 3 Ma-Trim63a 蛋白的三级结构预测图
Fig.3 The prediction of Ma-Trim63a protein tertiary structure

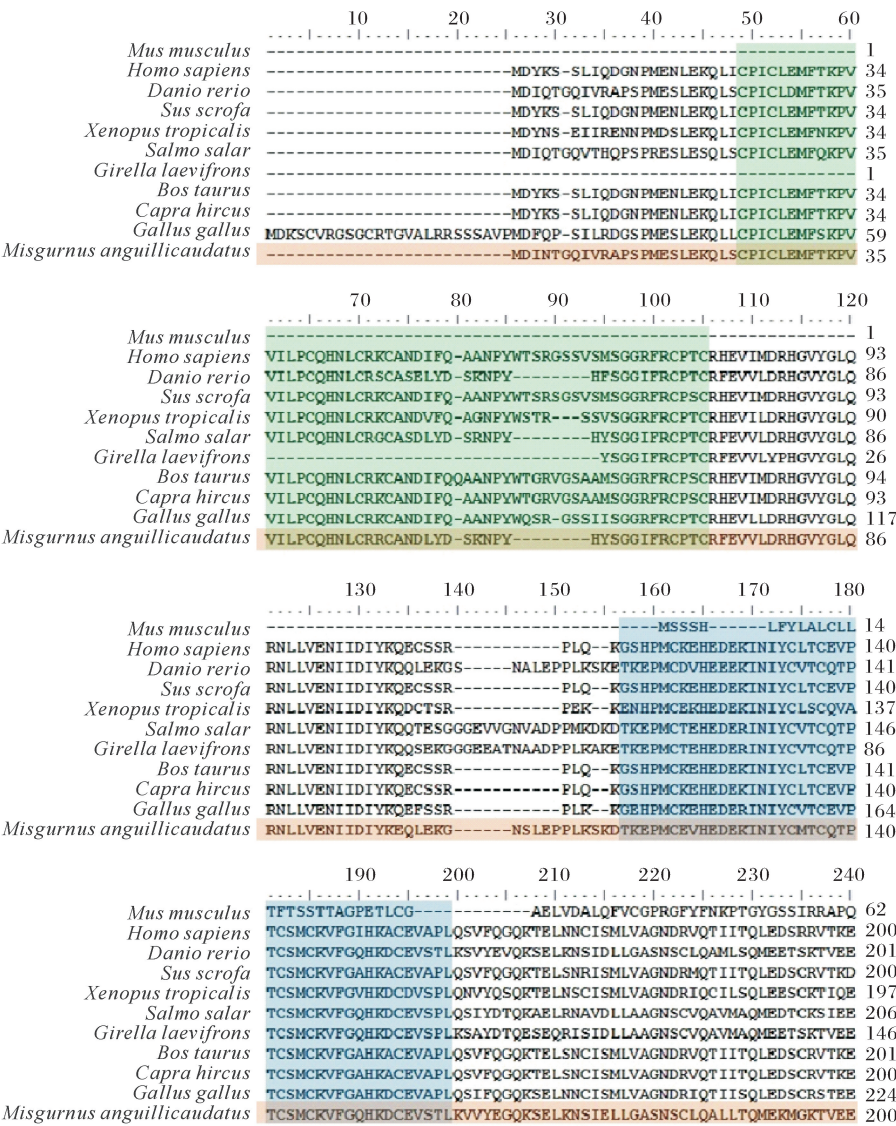
2.2 Ma-trim63a 基因的同源比对及系统发育分析

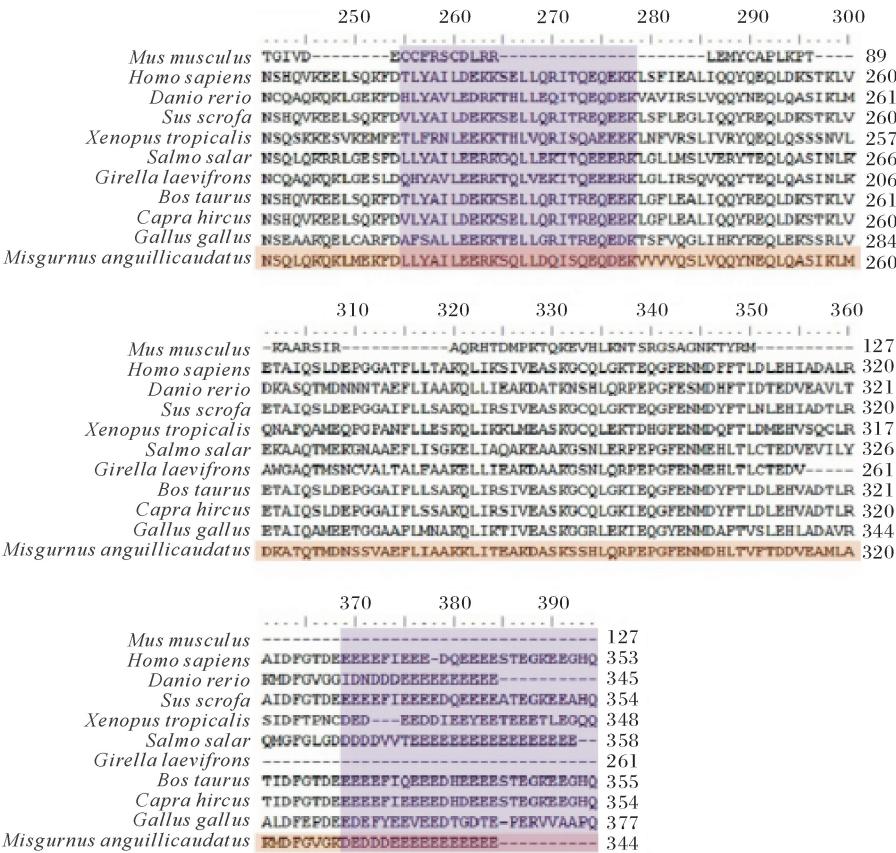
利用 BioEdit 软件将 Ma-Trim63a 的氨基酸序列与其他脊椎动物进行多重序列比对分析。比对结果显示, Ma-Trim63a 与其他硬骨鱼类的序列相似程度较高, 其中, 与斑马鱼的序列相似程度最高为 85%, 其次与大西洋鲑的序列相似程度为 70%。与哺乳动物序列相似程度较低, 与小鼠(*Mus musculus*)序列相比的相似程度仅有 54%(表 2)。但 Ma-Trim63a 与其他物种蛋白质结构功能域保守性较高(图 4)。对 11 种脊椎动物 TRIM63 的核苷酸序列进行的系统进化树构建, 结果如图 5 所示: 泥鳅的 Ma-Trim63a 与斑马鱼 Trim63a 在进化上亲缘关系最近, 并形成一个分支, 然后与其他硬骨鱼类聚为一支, 最后与哺乳动物、鸟类和两栖动物聚为一支。

表 2 TRIM63 氨基酸序列同源性比对

Table 2 The homology alignment of TRIM63 amino acid sequence

种名 Species	GenBank 登录号 GenBank accession No.	同源性/% Homology
人 <i>Homo sapiens</i>	NP_115977.2	54.22
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_001034137.2	53.61
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_001002133.1	84.76
野猪 <i>Sus scrofa</i>	NP_001171685.1	53.61
热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	NP_001072557.1	54.10
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	AGH92613.1	70.27
鲃 <i>Girella laeivifrons</i>	AHW50884.1	67.43
牛 <i>Bos taurus</i>	NP_001039760.1	54.57
山羊 <i>Capra hircus</i>	XP_005676882.1	54.74
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	XP_015153240.1	54.63





绿色区域为 trim63 的 RING fingers 结构,蓝色区域为 B-box 结构,紫色标记为 2 个卷曲螺旋结构。The RING fingers domain is stained with green,the B-box domain is stained with blue,the coiled-coil domains are stained with purple.

图 4 不同脊椎动物 TRIM63 氨基酸序列比对

Fig.4 The alignments of amino acid sequences of different vertebrate TRIM63

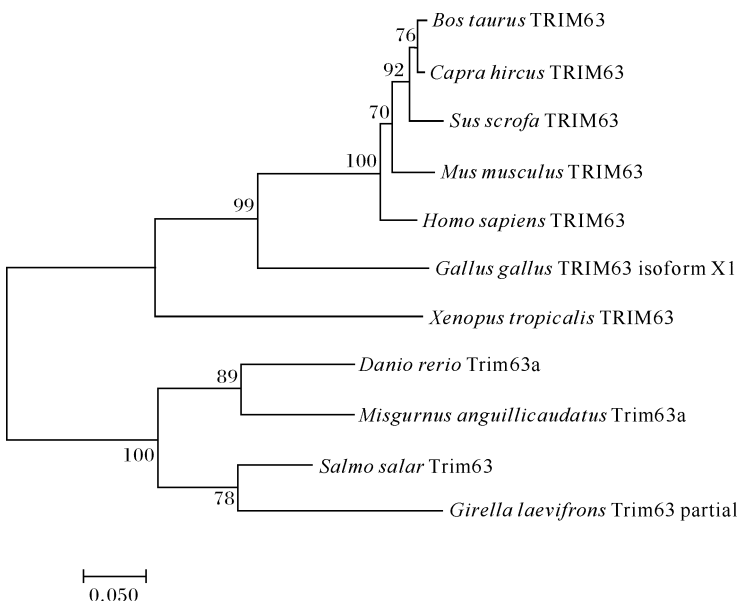
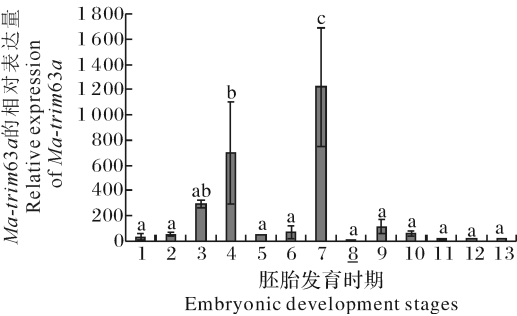


图 5 不同脊椎动物 TRIM63 氨基酸序列的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of amino acid sequences of different vertebrate TRIM63

2.3 *Ma-trim63a* 基因在泥鳅胚胎发育过程中的表达分析

以 β -actin 作为内参,采用 qPCR 检测 *Ma-trim63a* 基因在泥鳅二倍体和四倍体的胚胎各发育时期的表达情况,结果显示,*Ma-trim63a* 在 13 个胚胎发育时期均有表达。泥鳅二倍体胚胎 *Ma-trim63a* 在神经胚期表达量显著高于其他时期 ($P<0.05$),其次是多细胞期,在受精卵期、1 细胞期、4~8 细胞期、囊胚期、原肠胚期、肌节出现期、肌肉效应期、尾鳍褶出现期、晶体出现期、心跳期和出膜期表达量差异较小(图 6)。泥鳅四倍体胚胎 *Ma-trim63a* 在神经胚期表达量显著高于其他时期 ($P<0.05$),在受精卵期、1 细胞期、4~8 细胞期、多细胞期、囊胚期、原肠胚期、肌节出现期、肌肉效应期、尾鳍褶出现期、晶体出现期、心跳期和出膜期表达量较低,差异不显著(图 7)。



1:受精卵;2:1 细胞期;3:4~8 细胞期;4:多细胞期;5:囊胚期;6:原肠胚期;7:神经胚期;8:肌节出现期;9:肌肉效应期;10:尾鳍褶出现期;11:晶体出现期;12:心跳期;13:出膜期。柱间无相同小写字母表示组间差异显著 ($P<0.05$),柱间标有相同小写字母表示组间差异不显著 ($P>0.05$)。各组基准用黑色下划线标出。下同。1:Fertilized egg; 2:1-cell stage; 3:4-8-cell stage; 4:Multi-cell stage; 5:Blastula stage; 6:Gastrula stage; 7:Neurula stage; 8:Myomere formation stage; 9:Muscular contraction stage; 10:Rudiment of tail stage; 11:Eye lens formation stage; 12:Heartbeat stage; 13:Hatched larva. Values without the same letter mean significant difference ($P<0.05$), and values with the same letter mean no significant difference ($P>0.05$). The benchmark of each gene is underlined with black line. The same as below.

图 6 泥鳅二倍体胚胎发育过程中 *Ma-trim63a* 的表达
Fig.6 Expression of *Ma-trim63a* in different embryo development stages in diploid *M. anguillicaudatus*

2.4 *Ma-trim63a* 基因在泥鳅各组织中的表达分析

以 β -actin 作为内参基因,采用 qPCR 检测

Matrim63a 基因在泥鳅二倍体和四倍体各组织中的表达,结果显示,*Ma-trim63a* 在 7 个组织中均有表达,且在泥鳅二倍体和四倍体组织中的表达量相对一致。泥鳅二倍体成鱼 *Ma-trim63a* 在肌肉和心脏中表达量显著高于其他组织 ($P<0.05$),在肝脏、脾脏、肾脏、脑和鳃中表达量差异较小(图 8)。泥鳅四倍体成鱼 *Ma-trim63a* 在肌肉和心脏中表达量显著高于其他组织 ($P<0.05$),在肝脏、脾脏、肾脏、脑和鳃中表达量差异较小(图 9)。

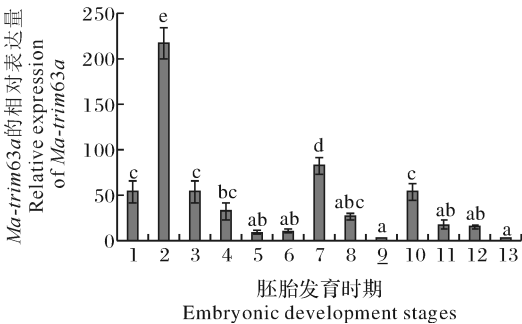
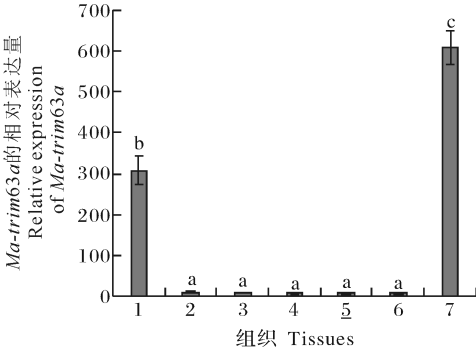


图 7 泥鳅四倍体胚胎发育过程中 *Ma-trim63a* 的表达
Fig.7 Expression of *Ma-trim63a* in different embryo development stages in tetraploid *M. anguillicaudatus*



1:心脏;2:肝脏;3:脾脏;4:肾脏;5:脑;6:鳃;7:肌肉。柱间无相同小写字母表示组间差异显著 ($P<0.05$),柱间标有相同小写字母表示组间差异不显著 ($P>0.05$)。各组基准用黑色下划线标出。下同。1: Heart; 2: Liver; 3: Spleen; 4: Kidney; 5: Brain; 6: Gill; 7: Muscle. Values without the same letter mean significant difference ($P<0.05$), and values with the same letter mean no significant difference ($P>0.05$). The benchmark of each gene is underlined with black line. The same as below.

图 8 泥鳅二倍体成鱼组织中 *Ma-trim63a* 的表达
Fig.8 Expression of *Ma-trim63a* in different tissues in diploid *M. anguillicaudatus*

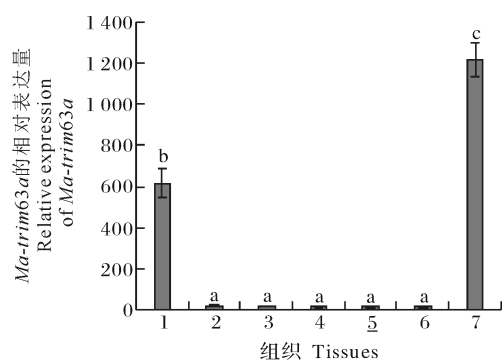


图9 泥鳅四倍体成鱼组织中 *Ma-trim63a* 的表达

Fig.9 Expression of *Ma-trim63a* in different tissues in tetraploid *M. anguillicaudatus*

3 讨论

本研究克隆出泥鳅 *Ma-trim63a* 基因 CDs 序列,该基因的长度和编码氨基酸序列与其他物种序列具有较高的相似度,尤其是与硬骨鱼类序列相似度更高。生物学信息分析结果显示,泥鳅 *Ma-Trim63a* 蛋白具有 TRIM 家族蛋白典型的特征结构域,包括 RING-fingers、B-box 和卷曲螺旋,而且 RING-fingers 结构域序列与其他硬骨鱼类该结构域有高度的保守性,初步说明 TRIM 家族蛋白功能的高度保守性。

目前在人和其他哺乳动物中并未发现 *TRIM63* 亚型,但是在硬骨鱼类中,发现其有亚型的存在,例如斑马鱼中包含 2 个亚型^[5],大西洋鲑中包含 3 个亚型^[16],而且亚型间均表现为高度同源,其亚型的存在可能是由于硬骨鱼类全基因组复制产生的^[25],在大西洋鲑中,饥饿时期 *trim63a*、*trim63b* 和 *trim63c* 基因表达的调节在不同组织中会发生不同,表明 *trim63* 型可能在功能上存在差异^[16]。目前在对我国泥鳅多倍体的研究中发现,泥鳅四倍体目前正在二倍化过程中,但二倍化未完全^[26],因此泥鳅中是否存在 *trim63* 的其他亚型,泥鳅多倍体中是否存在多个亚型还需进一步研究。

trim63 在硬骨鱼类胚胎发育时期表达未见报道,本研究对其在泥鳅二倍体和四倍体胚胎发育时期的表达进行了初步研究,结果显示 *Ma-trim63a* 在胚胎发育过程中均有表达,其表达在泥鳅二倍体和四倍体胚胎不同发育时期的情况不同,表明 *Ma-Trim63a* 在泥鳅二倍体和四倍体胚胎发育时期的分子调控机制有所差异,需要进一步研究。*Ma-*

trim63a 在泥鳅二倍体和四倍体胚胎神经胚期的显著表达,可以推测 *Ma-trim63a* 在胚胎发育初期可能与肌节的形成有关,硬骨鱼类的骨骼肌来源于原肠胚期形成的中胚层^[27],在神经胚期,中胚层分化为 3 部分,其中上段中胚层增厚分节成为肌节,有研究表明,TRIM63 作为一种肌节相关蛋白与肌肉分解代谢密切相关^[10],表明泥鳅 *Ma-Trim63a* 在胚胎发育时期参与骨骼肌的合成和代谢。

本试验采用 qPCR 方法检测到 *Ma-trim63a* 在泥鳅二倍体和四倍体成鱼的 7 个组织中均有表达,且表达情况基本一致,因此,*Ma-trim63a* 在泥鳅二倍体和四倍体成鱼中的表达量差异是否是造成生长速度和体型差异的主要原因仍需进一步探讨。*Ma-trim63a* 在多种泥鳅组织中均有表达,这与哺乳动物中 *TRIM63* 仅于骨骼肌中特异表达的结果不一致^[28],可能是由于硬骨鱼类和哺乳动物中蛋白质的代谢机制不同,且鱼类肌肉的生长受多种因素的影响,如营养^[29]和健康状况^[30]等,*Ma-trim63a* 在不同组织中的表达则可能预示着其在硬骨鱼类中功能更复杂。在哺乳动物中 *TRIM63* 在骨骼肌中表达且定位于肌节^[11],其功能与骨骼肌蛋白的分解代谢作用相关,*Ma-trim63a* 在泥鳅肌肉和心脏中的显著表达表明了骨骼肌蛋白中的潜在作用,预示其在组织中的表达和功能类似。Tacchi 等^[16]对大西洋鲑进行组织表达分析时报道,*trim63* 在脾脏、肾脏和脑中的表达表明这些组织可能产生能被 Trim63 蛋白识别并泛素化的底物,从而控制蛋白质的合成和分解,在鳃中的表达可能与该组织中高水平的蛋白质周转有关^[31],也有研究表明 *trim63* 在肝脏中的表达可能与肝脏在肌肉分解时氨基酸代谢过程中发挥着重要作用有关^[32]。对其功能研究时结果显示,在虹鳟饥饿和产卵诱导的肌肉萎缩期间 *trim63* 的基因表达量上调^[17],并且在大西洋鲑肌肉蛋白质水解过程中显著上调^[33],因此,推测泥鳅 *Ma-Trim63a* 可能也具有调控肌肉蛋白质的功能,通过调控蛋白的泛素化过程,参与肌肉分解代谢过程,但其具体的功能和作用机制仍需进一步研究。本试验结果与这些研究具有一定相似性,说明泥鳅 *Ma-Trim63a* 在控制肌肉蛋白质的合成和分解中发挥作用,进一步验证了 Trim63 在进化过程中的功能保守性。本研究中泥鳅 *Ma-trim63a* 基因的克隆为进一步研究 *Ma-Trim63a* 在泥鳅肌肉分解代谢过

程中的作用奠定了基础,为研究肌肉生长的相关基因提供了参考,同时也为增加泥鳅在养殖中的肌肉产量、提高养殖效益提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] ROCK K L, GRAMM C, ROTHSTEIN L, et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules [J]. *Cell*, 1994, 78(5): 761-771.
- [2] JACKMAN R W. The molecular basis of skeletal muscle atrophy [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287(4): 834-843.
- [3] 朱荣. 泛素蛋白酶体途径在运动骨骼肌领域的研究进展 [J]. *北京体育大学学报*, 2012(9): 85-91.
- [4] 郭艳利, 马延超. 运动与泛素蛋白连接酶 MAFbx 和 MuRF1 [J]. *内江科技*, 2014(2): 111-112.
- [5] MACQUEEN D J, FUENTES E N, VALDES J A, et al. The vertebrate muscle-specific RING finger protein family includes MuRF4-A novel, conserved E3-ubiquitin ligase [J]. *FEBS Lett*, 2016, 588(23): 4390-4397.
- [6] SAURIN A J, BORDEN K L B, BODDY M N, et al. Does this have a familiar RING? [J]. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21(6): 208-214.
- [7] REYMOND A, MERONI G, FANTOZZI A, et al. The tripartite motif family identifies cell compartments [J]. *The EMBO journal*, 2001, 20(9): 2140-2151.
- [8] KAMURA T. *Rbx1*, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase [J]. *Science*, 1999, 284(5414): 657-661.
- [9] 徐利斯. 蛋白质降解介导骨骼肌生长的研究进展 [J]. *当代体育科技*, 2018, 8(7): 14-15.
- [10] BODINE S C. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy [J]. *Science*, 2001, 294(5547): 1704-1708.
- [11] CENTNER T, YANO J, KIMURA E, et al. Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain [J]. *J Mol Biol*, 2001, 306(4): 717-726.
- [12] KEDAR V, MCDONOUGH H, ARYA R, et al. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2005, 101(52): 18135-18140.
- [13] HASUMURA T, MEGURO S. Exercise quantity-dependent muscle hypertrophy in adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *J Comp Physiol B*, 2016, 186(5): 603-614.
- [14] SHIMIZU H, LANGENBACHER A D, HUANG J, et al. The calcineurin-FoxO-MuRF1 signaling pathway regulates myofibril integrity in cardiomyocytes [J/OL]. *eLife*, 2017, 6: e27955 [2019-04-30]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5576919/>.
- [15] FUENTES E N, ZULOAGA R, ALMARZA O, et al. Upwelling-derived oceanographic conditions impact growth performance and growth-related gene expression in intertidal fish [J]. *Comp Biochem Physiol, Part B: Biochem Mol Biol*, 2017, 214: 12-18.
- [16] TACCHI L, BICKERDIKE R, SECOMBES C J, et al. Muscle-specific RING finger (*MuRF*) cDNAs in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and their role as regulators of muscle protein degradation [J]. *Marine biotechnology*, 2012, 14(1): 35-45.
- [17] WANG J. Molecular characterization of the *MuRF* gene family: potential role in rainbow trout muscle degradation [J]. *Comp Biochem Physiol, Part B: Biochem Mol Biol*, 2011, 158(3): 208-215.
- [18] COMBER S C L, SMITH C. Polyploidy in fishes: patterns and processes [J]. *Biological journal of the linnean society*, 2004, 82(4): 431-442.
- [19] 周小云. 湖北省多倍体泥鳅分布格局及泥鳅育种基础研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [20] LI Y J, ZHANG M Z, QIAN C, et al. Fertility and ploidy of gametes of diploid, triploid and tetraploid loaches, *Misgurnus anguillicaudatus*, in China [J]. *J Appl Ichthyol*, 2012, 28(6): 900-905.
- [21] CUI L, ABBAS K, YU Y, et al. First record of the natural occurrence of pentaploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus* in Hubei Province, China [J]. *Folia Zool*, 2013, 62(1): 14-18.
- [22] YU Y Y, ABBAS K, WANG W M, et al. Geographical distribution of ploidy level variation of loach *Misgurnus anguillicaudatus* in China [J]. *Pak J Agri Sci*, 2014, 51(2): 273-281.
- [23] FENG B, YI S V, LI R, et al. Comparison of age and growth performance of diploid and tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* in the Yangtze River basin, China [J]. *Environ Biol Fish*, 2017, 100(7): 815-828.
- [24] 石军, 褚武英, 张建社. 鱼类肌肉生长分化与基因表达调控 [J]. *水生生物学报*, 2013(6): 1145-1152.
- [25] VOLFF J N. Genome evolution and biodiversity in teleost fish [J]. *Heredity*, 2005, 94(3): 280-294.
- [26] LI Y J, TIAN Y, ZHANG M Z, et al. Chromosome banding and FISH with rDNA probe in the diploid and tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Ichthyol Res*, 2010, 57(4): 358-366.
- [27] 裴建菊. 鳅骨骼肌慢肌胚胎期发生与胚后生长发育 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
- [28] 刘亚南. 间歇运动抑制 E3 泛素连接酶 MuRF1 对心梗大鼠心肌和骨骼肌的保护效应 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2017.
- [29] GOMEZ R P, CALDUCH G J, CELIS S V R, et al. Regulation of the somatotrophic axis by dietary factors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Br J Nutr*, 2005, 94(3): 353-361.
- [30] JOHANSEN K A, SEALEY W M, OBERTURF K. The effects of chronic immune stimulation on muscle growth in rainbow trout [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2006,

144 (4):520-531.

[31] LYNDON A R, HOULIHAN D F. Gill protein turnover: costs of adaptation[J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 1998, 119(1):27-34.

[32] WRIGHT P A. Dogmas and controversies in the handling of nitrogenous wastes: expression of arginase type I and II genes in rainbow trout; influence of fasting on liver enzyme activity and mRNA levels in juveniles[J]. J Exp Biol, 2004, 207(12):2033-2042.

[33] TACCHI L, BICKERDIKE R, SECOMBES C J, et al. Ubiquitin E3 ligase atrogin-1 (*Fbx-32*) in Atlantic salmon (*Salmo salar*): sequence analysis, genomic structure and modulation of expression[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2010, 157(4):364-373.

Cloning and expression analysis of *trim63a* in
diploid and tetraploid *Misgurnus anguillicaudatus*

SONG Xiaoran ZHAN Fanbin WANG Weimin

College of Fisheries/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Trim63 (tripartite motif containing 63), also known as muscle RING finger protein 1 (MuRF1), plays an important role in the development and differentiation of the muscles in mammals. Partial cDNA sequence of the *Misgurnus anguillicaudatus trim63a* gene (*Ma-trim63a*) was cloned in this study. Sequence analysis showed that the full-length *Ma-trim63a* CDs was 1 035 bp, encoding 344 amino acids, which shared high similarity with those of other teleosts. The *Ma-trim63a* mRNA expression in different tissues of the adults and during embryonic developmental stages in the diploid and tetraploid *M. anguillicaudatus* were examined by qPCR. *Ma-trim63a* showed highest expression in the muscle and followed by the heart. During embryonic development, *Ma-trim63a* was examined in all the 13 stages with different expression levels.

Keywords *Misgurnus anguillicaudatus*; *trim63a*; polyploid; muscle catabolism; clone; expression analysis

(责任编辑:边书京)