

# 翘嘴鲌(*Culter alburnus*)TMEM-57 基因的克隆、组织表达和单核苷酸多态性分析\*

祁鹏志<sup>1</sup> 郭宝英<sup>2</sup> 谢从新<sup>1</sup> 吴常文<sup>2</sup> 陆诗敏<sup>1</sup> 段友健<sup>1</sup>

(1. 华中农业大学水产学院 武汉 430070; 2. 浙江海洋学院 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316004)

**摘要** 采用 RT-PCR 和快速扩增 cDNA 末端(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术首次克隆了翘嘴鲌 TMEM-57 蛋白基因的 cDNA 全序列, 该序列全长为 2822bp, 其中 5'-UTR 区 93bp, 3'-UTR 区 731bp, 开放阅读框(open reading frame, ORF)为 1998bp, 编码 665 个氨基酸。NJ 法系统进化分析将同科或属中 TMEM-57 基因分成一个分支, 表现出种属间的高度保守性。利用荧光定量 PCR(qPCR)技术检测了不同组织的表达量, 发现在卵巢中表达量最高, 其次为心脏和脑。用直接测序法对 TMEM-57 基因部分区段单核苷酸多态性(SNP)进行了检测, 寻找到 11 个新的 SNP 位点。

**关键词** 翘嘴鲌, TMEM-57, 荧光定量 PCR, 单核苷酸多态性  
**中图分类号** Q78

翘嘴鲌(*Culter alburnus*), 又名翘嘴巴、鲌鱼、大白鱼等, 属鲤科(Cyprinidae)、鲌亚科(Cultrinae)、鲌属(*Culter*)。翘嘴鲌广泛分布于我国诸多水系, 是一种名贵的经济鱼类。翘嘴鲌是鲌亚科中体型最大的一种, 在太湖为“三宝”之一, 与松江鲈、黄河鲤和松花江鲑一起被誉为中国四大名鱼(倪勇等, 2006)。翘嘴鲌生活在湖泊、水库和外荡等大水体中。成鱼一般在敞水区的中、上层活动, 游动迅速、性情暴烈、善跳跃; 幼鱼成群生活在水流较缓慢的浅水区域。自人工繁殖技术解决后, 翘嘴鲌养殖规模不断扩大, 已发展成为中国主要的淡水养殖对象之一。当前, 对翘嘴鲌的研究多集中于养殖技术(周剑等, 2005)、苗种繁育(张晓光等, 1998; 吴维新等, 2004)、生物学(张小谷等, 2005; 顾志敏等, 2008)等方面, 分子水平的基础研究较少, 仅见于不同地理种群的遗传多样性方面(王伟等, 2008; 杨太有等, 2008)。深入开展翘嘴鲌分子水平的基础研究, 对了解翘嘴鲌的系统发育及进化, 以及野生资源保护、品种选育都是十分必要的。

TMEM-57 (transmembrane protein57)又名 Macoilin-1, 是一种由 664 个氨基酸组成的多次跨膜蛋白,

共有 3 种亚型, 未修饰前的大小分别为 76、35 和 50kDa。它主要分布在肺、睾丸、胰脏、脾脏、肝脏、脑、胸腺、肾脏和肌肉组织。人 Macoilin-1 被认为在轴突交通或信号传导中发挥作用(Strausberg *et al*, 2002; Kuvbachieva *et al*, 2004; Toshio *et al*, 2004)。这种作用在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)得到证明, maco-1 突变体的 AFD 和 AIY 神经元对热刺激反应减弱(Akiko *et al*, 2011), 从侧面证实 Macoilin-1 可能在神经信号传导中发挥重要作用。该蛋白的编码基因和鼠基因达到 99%的同源性, 可能在种属间发挥保守作用(Georgas *et al*, 2009)。该基因为近年来新发现的基因, 仅在人、小鼠、线虫、黑猩猩等中被克隆到。在鱼类中, 仅在斑马鱼(*Danio rerio*)和红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)及其它几种模式鱼类中被发现, 目前功能尚不十分清楚。本研究克隆了翘嘴鲌 TMEM-57 基因 cDNA 全长, 以此为基础, 设计特异引物, 扩增了部分内含子区, 用直接测序法对此区段的单核苷酸多态性进行了检测, 并用 qPCR 检测了该基因在不同组织中的表达情况, 丰富了翘嘴鲌的分子生物学研究。鉴于 TMEM-57 在神经信号通路中的

\* 国家科技支撑计划, 2012BAD25B06 号。祁鹏志, 博士研究生, E-mail: qxc2004@yahoo.com.cn

通讯作者: 谢从新, 教授, 博士生导师, E-mail: xiecongxin@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2012-01-17, 收修改稿日期: 2012-03-05

重要作用, 为研究翘嘴鲌对外界环境刺激的适应机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验用翘嘴鲌(*Culter alburnus*)购自湖北省蕲春市赤东湖。大肠杆菌 DH5<sup>+</sup>、pMD18-T 载体、T4 连接酶和 Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; Trizol、Platinum<sup>®</sup>SYBR<sup>®</sup>Greend 定量 PCR SuperMix-UDG 购自 Invitrogen 公司; RNA 纯化试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司; RevertAid<sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Ferments 公司; SMART<sup>™</sup> RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司; 引物均由 Invitrogen 公司合成; 其它常规试剂购于上海生工生物技术有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计与合成** 利用在线软件 Web Primer 设计 TMEM-57 cDNA 克隆、qPCR、SNP 筛查引物(表 1)。T57-1、T57-2、T57-3 为 cDNA 中间片段扩增引物; T57-ORF 为开放阅读框扩增引物; T-DNA-1、T-DNA-2、T-DNA-3、T-DNA-4 为 SNP 搜寻引物; T57-real-2 为 qPCR 引物; R371-1、R371-2、R371-3 为 5'RACE 引物; 3'181-1、3'181-2 为 3'RACE 引物。

**1.2.2 TMEM-57 全长 cDNA 克隆** 采集翘嘴鲌卵巢组织, Trizol 保存。常规 Trizol 抽提法提取总 RNA,

RNA 纯化试剂盒纯化后, 用 RevertAid<sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit 推荐方法进行反转录, 所用引物为 oligo(dT)<sub>18</sub> primer, 反应条件: 42℃ 60min, 72℃ 5min。用引物 T57-1、T57-2、T57-3 扩增中间片段, 反应条件: 94℃ 预变性 3min, 94℃ 变性 30s, 58℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 5min。PCR 产物胶回收后连接至 pMD18-T Vector, 转化, 挑取单菌落, 摇菌, 测序。测序结果经在线软件 CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) 拼接。根据所获得的中间片段, 按照 SMART<sup>™</sup> RACE cDNA Amplification Kit 要求设计 5' 和 3'RACE 引物(表 1), 按说明书推荐方法进行 PCR 扩增。用引物 R371-1 进行反转录合成第一链 cDNA, 经纯化和末端加 C 后, 用引物 R371-2 和试剂盒附带铆钉引物进行第一轮 PCR 扩增, 反应条件: 94℃ 预变性 3min, 94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min, 最后 72℃ 延伸 5min; 用引物 R371-3 和试剂盒附带桥连引物进行巢式 PCR 第二轮扩增, 反应条件同上, PCR 产物经克隆测序。利用试剂盒附带 3'CDS primer A 引物进行反转录合成第一链 cDNA, 使用引物 3'181-1 和 UPM 进行第一轮 touchdown PCR 扩增; 将第一轮 PCR 扩增产物稀释后, 用引物 3'181-2 和 UPM 进行第二轮 touchdown PCR 扩增, PCR 产物经克隆测序。使用 ExPASy 数据库中的 ProtParam (<http://kr.expasy.org/tools/protparam.html>) 工具分析蛋白质的基本理化性质; 用 TMpred (<http://www.ch.embnet.org/>)

表 1 RT-PCR、RACE、qPCR、SNP 筛查引物  
Tab.1 Primers for RT-PCR, RACE, qPCR, SNP detection

引物编号	正向引物序列(F引物)	反向引物序列(R引物)	扩增区域
T57-1	GAGTTCAGGTTTCGAGTACTTGTGG	GCATCCACAGTCTGTAAGATGTTG	261—971
T57-2	CCAGAACAGCAGATGCTTCAAA	ATGACCTCTGCGATCTTCTGCTT	706—1935
T57-3	TCGGCCATGCAGGACAAGA	ATTGGGGTCCAAGCTGGAA	1788—2104
T57-ORF	ATGAAGCGGCGCAATGCGGACTG	TCACTTCTTGAGCGGCTGGTA	94—2091
T-DNA-1	TACCTTTCTGTACTGAAGTTCCT	CTGTATGCCACACGTAAGTACC	2、3 外显子, 2 内含子
T-DNA-2	CATTGGTTATCCGGTGGTAACA	CCTCCTCTGCCTCTCGTTCCT	4 外显子
T-DNA-3	CCACCTCAAAAGGCATGTCT	TTGTTTTGCAGCAACTCATT	5、6 外显子, 5 内含子
T-DNA-4	TTGCAGAAGGAGCAGGAGATA	CTTAAATATGTACGTTACACCA	11 外显子, 3'-UTR
T57-real-2	CATTGGTTATCCGGTGGTAACA	CCTCCTCTGCCTCTCGTTCCT	
β-actin	TGCGTGACATCAAGGAGAAG	GCTGGAAGGTGGACAGAGAG	
R371-1	CTCGTTCTGTATGCCA		
R371-2	GGGATGAACAGGAGGCAGATG		
R371-3	TGCGACACACAAAAGAACACA		
3'185-1	GCCCAGCATCACCTACTCGGCAGAAAC		
3'185-2	AATGCCTCCGTCTACCAGCCGCTCAAG		

software/TMPRED\_form.html) 和 TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0) 预测蛋白质跨膜区; 在结构预测服务网站 Predict-Protein (http://www.predictprotein.org/) 预测蛋白质二级结构。BLASTp 于 GenBank 中进行相似性检索, Clustal X (Thompson *et al*, 1997) 软件对相应的氨基酸序列进行分析。然后用 MEGA 4.0 软件 (Tamura *et al*, 2007) 构建 TMEM-57 系统进化树。

**1.2.3 qPCR 检测基因在不同组织的表达量**  
提取卵巢、脑、肠、胃、心脏、肝脏、肌肉、肾脏、腮、肌肉 RNA, 纯化后, 反转录成 cDNA 第一链。用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增, 所用引物为 T57-real-2, 反应体系 10 $\mu$ l: Platinum<sup>®</sup>SYBR<sup>®</sup>Green qPCR SuperMix-UDG 5 $\mu$ l, nuclease-free water 3 $\mu$ l, cDNA 模板 1 $\mu$ l, T-DNA-2 F 和 R 均 0.5 $\mu$ l, 以 $\beta$ -actin 为内参, 所用引物为 $\beta$ -actin, 使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因的相对表达量, 其中  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因1} - Ct_{管家基因}) - (Ct_{目的基因2} - Ct_{管家基因})$ , 每个样品设 3 个平行管, 以溶解曲线判定扩增产物的特异性。实验结果以  $\bar{X} \pm SD$  表示, 用 SPSS 13.0 软件进行分析, 用单因素方差分析进行数据处理, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

**1.2.4 SNP 位点筛查** 酚氯仿法抽提 20 尾翘嘴鲈尾鳍 DNA, 用 T-DNA-1、T-DNA-2、T-DNA-3、T-DNA-4 引物进行 PCR 扩增, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。PCR 产物胶回收后直接送 Invitrogen 公司测序。测序结果用 Clustal X 软件进行序列比对, 发现 SNP 位点后, 用 Chromas 软件查看测序图谱, 进行人工校对。

## 2 结果

### 2.1 TMEM-57 基因 cDNA 全长

将扩增到的中间片段序列和末端序列经软件拼接后获得 TMEM-57 基因 cDNA 全长(图 1)。其全长为 2822bp, 包含 5'-UTR 区 93bp, 3'-UTR 区 731bp, 开放阅读框(ORF)为 1998bp, 编码 665 个氨基酸, 预测分子量大小和等电点分别为 76.11kDa 和 9.027, 原子总数 10747, 分子式  $C_{3365}H_{5400}N_{950}O_{1005}S_{27}$ , 不稳定系数 56.06, 属于不稳定蛋白质。经 TMpred 和 TMHMM 预

```

CCT GGC TCC TAT CCT ACA AAT TTG TAT CAA GCG CAA TAA TTT 45
CGC GTA GTT TCC CTC GAG TGT TTA AAG TTA TAG GAA TCT AAA GGG TGG AGA 93
ATG AAG CGG CGC AAT GCG GAC TGC AGC AAA CTC CGT CGC CCG 135
M K R R N A D C S K L R R P 14
TTG AAA CGG AAC CGA ATC ACC GAG GGT ATT CAC AGC AGT ACC TTT 180
L K R N R I T E G I H S S T F 29
GAG CAA GAC CTG CGC AGT CAG ATC AGC TCT CTG AGC AGT GCC GAG 1350
E Q D L R S Q I S S L S S A E 419
AGG AGC ATG CGC TCT GAG CTG GGG CAG CTC CGC CAG GAA AAT GAG 1395
R S M R S E L G Q L R Q E N E 434
TTG CTG CAA AAC AAG CTT CAT AAC GCT GTG CAG GCC AAG CAA AAG 1440
L L Q N K L H N A V Q A K Q K 449
GAC AAG CAA ACG ATT GTG CAG CTG GAG AAG CGT CTC AAG GCA GAA 1485
D K Q T I V Q L E K R L K A E 464
CAG GAA GCG CGA GCC GCT GTG GAA AAG CAG CTT GCA GAA GAG AAG 1530
Q E A R A A V E K Q L A E E K 479
AAA AGA AAG AAG ATG GAA GAG GCT ACA GCC GCA CGC GCT GTC GCT 1575
K R K K M E E A T A A R A V A 494
CTG GCA GCT GCC TCC AGA GGG GAA TGC ACG GAC TCC CTG AGG AAT 1620
L A A A S R G E C T D S L R N 509
CGC ATA CGT GAG CTG GAG TCG GAG TGC AGG AAG CTC AGT CAC GAC 1665
R I R E L E S E C R K L S H D 524
ATG AAG CTA AAG GAA GAA CAA ATC AGA GAG CTC GAG CTC AAA GCT 1710
M K L K E E Q I R E L E L K A 539
CAA GAG TTG CGT AAA TAT AAG GAG AAT GAA AAG GAC ACG GAG GTT 1755
Q E L R K Y K E N E K D T E V 554
ATT GCA GAG GTC ATG GCG GTC ATG CCC AGC ATC ACC TAC TCG GCA 1980
I A E V M A V M P S I T Y S A 629
GAA ACC AAC AAC ATG ACC CCT GTG ACC CCA CAT TAC TCC TCC AAG 2025
E T N N M T P V T P H Y S S K 644
TTC ATG GAC ACC AGT CCT TCC AGC TTG GAC CCC AAT GCC TCC GTC 2070
F M D T S P S S L D P N A S V 659
TAC CAG CCG CTC AAG AAG TGA ATG TTC ACA CAC ACG ACG TCC ACT 2115
Y Q P L K K *
GAT TAA GAA TGC ATT TCA GTT TAA TTA TGA CCA TAG TAT TGT GCA 2655
TCT GTT TTT GGA GAG GTA AAA TCA TTT CAT TAC AGA TGG ATC TGA 2700
ATT GGA TAT ATT TTT GGG TTT CAA TAA ACC AAA TTT CCC GTT CTT 2745
CCC AAT GCT GTT TTC CAA CAT GTC GAA GAC ACG ATA AAA ACC CAC 2790
GTG TTT AAA AAG AAA AAA AAA AAA AAA 2820

```

图 1 翘嘴鲈 TMEM-57 基因部分 cDNA 及氨基酸序列  
Fig.1 The cDNA and deduced amino acid partial sequences of TMEM-57 of *C. alburnus*

注: 下划线表示多聚腺苷酸加尾信号; \*为终止密码子

测, TMEM-57 存在 4 个跨膜区, 分别在 29—50, 71—96, 119—136, 153—176 区。通过 PredictProtein 预测, TMEM-57 存在 4 个跨膜区; 在 479 位置, 有一个明显的定位信号: KKRKK, 在植物中, 将该蛋白定位在线粒体或者叶绿体, 在动物和原核生物中, 定位在细胞质中; 含有 10 个半胱氨酸(Cys), 没有二硫键形成; 形成 3 个 N-糖基化位点, 依赖 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点 RKLS, 蛋白激酶 C 磷酸化位点 11 个, 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 8 个, 酪氨酸激酶磷酸化位点 3 个, 豆蔻酰化位点 8 个。用 Clustal X 将翘嘴鲌 TMEM-57 氨基酸序列与 NCBI 收录的 24 种主要物种 TMEM-57 氨基酸序列进行比对, 用软件 MEAG 4.0 软件构建了基于翘嘴鲌 TMEM-57 氨基酸序列的系统进化树(图 2), 结果显示翘嘴鲌 TMEM-57 与斑马鱼(*Danio rerio*)亲缘关系最近, 并被分成一个分支, 其次为红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)。

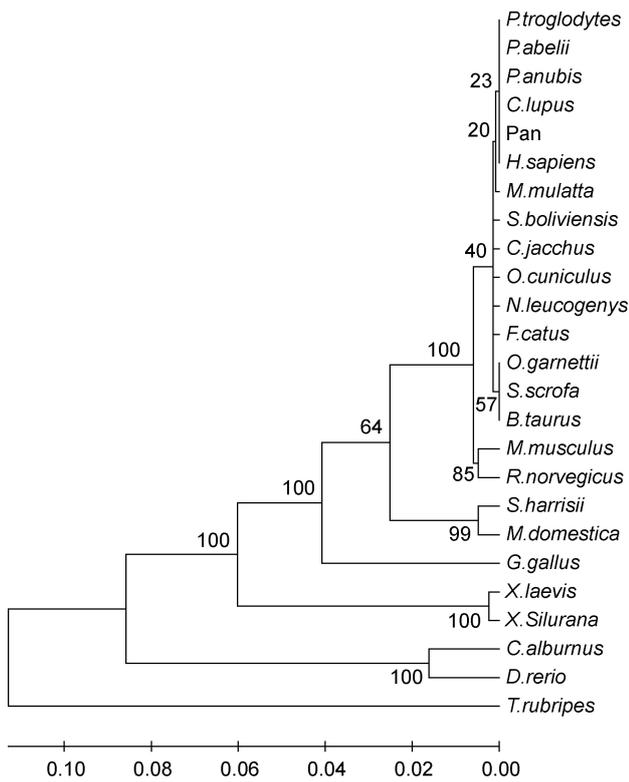


图 2 翘嘴鲌 TMEM-57 氨基酸序列构建系统进化树

Fig.2 The phylogenetic tree constructed with the amino acid sequence of *C. alburnus* TMEM-57

### 2.2 翘嘴鲌 TMEM-57 基因组织表达谱分析结果

TMEM-57 和 $\beta$ -actin 分别用 T57-real-2F、T57-real-2R 和 $\beta$ -actin F、 $\beta$ -actin R 扩增, 目的片段长度和设计一致。用 qPCR 进行定量分析, 结果显示,

TMEM-57 基因在所检测的卵巢、脑、肠、胃、心脏、肝脏、肌肉、肾脏、腮、肌肉等 10 种组织中均有不同程度表达, 在卵中表达量最高, 其次为心脏、脑(图 3)。

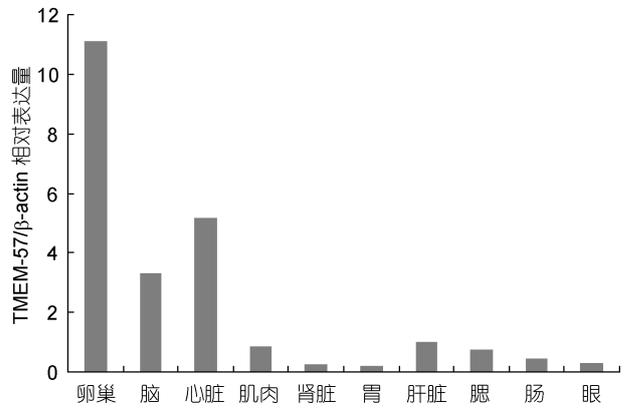


图 3 翘嘴鲌不同组织 TMEM-57 mRNA 表达谱

Fig.3 The expression pattern of TMEM-57 mRNA in tissues of *C. alburnus*

### 2.3 SNP 密度、频率和类型分布

在四对引物的扩增产物中, 共检测到 SNP 位点 11 个。平均大约 100bp 即发现一个。主要碱基频率为 0.583—0.929, 次要碱基频率为 0.071—0.417。其中 3 个 SNP 位点发生在内含子区, 3 个发生在 3-UTR 区, 5 个发生在外显子区。5 个外显子区 SNP 位点中, 2 个是同义突变, 3 个是错义突变, 引起氨基酸序列的改变(表 2)。11 个 SNP 的类型分布(表 3), 其中, 转化型为 6 个, 占比 54.5%, 颠换型 5 个, 占比 45.5%。

### 3 讨论

TMEM-57 (transmembrane protein57)又名 Macoilin-1, 人类 TMEM-57 是一种由 664 个氨基酸组成的多次跨膜蛋白, 共有 3 种亚型, 未修饰前的大小分别为 76、35 和 50kDa。它主要分布在肺、睾丸、胰脏、脾脏、肝脏、脑、胸腺、肾脏和肌肉组织。人 Macoilin 被认为在轴突交通或信号传导中发挥作用 (Strausberg *et al*, 2002; Kuvbachieva *et al*, 2004; Noah *et al*, 2008)。这种作用在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)得到证明, maco-1 突变体的 AFD 和 AIY 神经元对热刺激反应减弱(Akiko *et al*, 2011)。翘嘴鲌 TMEM-57 在卵巢、肌肉、心脏、脑、肾脏、眼、胃、肠、肝脏、腮等组织中均有表达, 与 Strausberg 等(2002)在人类中的发现一致, 证实该基因并无组织特异性, 可能在有机体生命活动运行发挥基础性作用。在卵、心脏、脑中表达量显著高于其它组织, 从侧面证实该

表 2 翘嘴鲌 TMEM-57 基因片段单核苷酸多态性(SNP)位点  
Tab.2 The single nucleotide polymorphism loci in certain sections of *C. alburnus* TMEM-57 gene

SNP 位点	SNP 位点两端序列	位置	主要碱基/频率	次要碱基/频率	氨基酸改变
Snpl	AATCCCCA(G/T)TGTTGTGT	二内含子	G/0.818	T/0.182	—
Snp 2	TTCTTGGT(C/T)CTTTGTAA	二内含子	C/0.818	T/0.182	—
Snp 3	TGGCTGTT(C/T)TTCGCCGC	三外显子	C/0.909	T/0.091	不变
Snp 4	GAGAGGCA(G/A) AGGAGGCC	四外显子	G/0.929	A/0.071	Glu Lys
Snp 5	CAAGAAAC(G/A)CCCATGTC	五外显子	G/0.786	A/0.214	不变
Snp 6	TGTTTAT (C/T)CCTTTTC	五内含子	C/0.929	T/0.071	—
Snp 7	AACCAACA(A/G)CATGWCCC	十一外显子	A/0.917	G/0.083	Asn Ser
Snp 8	ACAACATG(T/A) CCCCTGTG	十一外显子	A/0.583	T/0.417	Thr Leu
Snp 9	GACGTCCA(C/A)TTTGCTCT	3'-UTR	C/0.917	A/0.083	—
Snp 10	CCTAAATT(C/A) TTTTCTTG	3'-UTR	C/0.917	A/0.083	—
Snp 11	GGTGGCAT(C/T)ACTTCTTT	3'-UTR	C/0.917	T/0.083	—

表 3 翘嘴鲌 TMEM-57 基因片段单核苷酸多态性  
(SNP)类型分布

Tab.3 The types and ratios of single nucleotide polymorphism loci in some sections of *C. alburnus* TMEM-57 gene

类型	碱基	数目	比例(%)
转换型	C/T	4	63.6
	A/G	3	
颠换型	A/C	2	36.4
	A/T	1	
	G/C	0	
	G/T	1	

基因可能在生殖、神经传导以及血液循环过程中发挥更大作用。在 N 端没有发现信号肽, 在氨基酸序列 479 位置发现一个明显的定位信号: KKRKK。在植物中, 将该蛋白定位在线粒体或者叶绿体; 在动物和原核生物中, 定位在细胞质。在 N 端发现 4 个明显的疏水区, 说明该蛋白存在跨膜区, 应为跨膜蛋白。出现预测不一致的原因, 作者认为可能与软件编程方法以及数据库覆盖程度有关。在人类中 TMEM-57 被认定为是一种跨膜蛋白, 通过不同的软件均预测到翘嘴鲌 TMEM-57 氨基酸序列存在 4 个跨膜区, 将翘嘴鲌中 TMEM-57 定位为跨膜蛋白似乎更准确。系统进化树表明, TMEM-57 基因的进化距离和物种进化距离基本上是一致的。翘嘴鲌 TMEM-57 基因与同科的斑马鱼该基因亲缘关系最近, 并被分成一个分支, 其次是同属辐鳍鱼纲的红鳍东方鲀。同科或同属中 TMEM-57 基因被分成一个分支, 表现出种属间的高度保守性, 这与 Georgas 等(2009)的研究结果一致。Georgas 等(2009)发现在人中该蛋白的编码基因和鼠基因达到 99%的同源性, 可能在种属间发挥保守作用。

本研究对翘嘴鲌 TMEM-57 部分区段进行了 SNP 筛查, 共找到 11 个新的 SNP 位点。平均 100bp 左右发现一个 SNP 位点, 这与马宁等(2008)在凡纳滨对虾发现的一致, 远大于先前人类中每 500—1000bp 发现一个 SNP 位点的频率。除去测序产生误差的因素, 作者认为 SNP 的发生频率可能和物种及基因类型有关, 在进化过程中处于低等位置的物种 SNP 的发生频率可能更高一些。所有的 SNP 位点均为二等位性, 并未发现三、四等位性, 转换与颠换发生的比率大致为 1 : 2, C/T 转换发生的比例为 36.3%, 远高于其它形式, 与 Halushka 等(1999)、Wang 等(1998)的结果一致。新发现的 SNP 位点中, 有 3 个是外显子中的错义突变位点, 即 Snp 4: Glu Lys, Snp 7: Asn Ser, Snp 8: Thr Leu, 这对于 TMEM-57 相关生物学活性有何影响, 值得进一步研究。

TMEM-57 作为近年来发现的一种新蛋白, 其具体功能尚不十分清楚, 因此有必要对其蛋白结构进行深入研究, 为最终解析其生物学功能奠定基础。

### 参 考 文 献

- 马 宁, 陈晓汉, 曾地刚等, 2008. 凡纳滨对虾组织蛋白酶 L 基因的单核苷酸多态性分析. 武汉大学学报, 54(4): 503—506
- 王 伟, 陈立侨, 禹 娜等, 2008. 应用 CO II 基因部分序列分析翘嘴鲌群体的遗传多样性. 大连水产学院学报, 23(5): 403—408
- 杨太有, 陈宏喜, 刘向奇等, 2008. 丹江口水库翘嘴红鲌 (*Erythroculter ilishaeformis*)遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析. 海洋与湖沼, 39(3): 240—244
- 吴维新, 张小立, 刘纯生等, 2004. 翘嘴鲌苗种批量化生产技术. 内陆水产, 12: 28

- 张小谷, 熊邦喜, 2005. 翘嘴鲌的生物学特性及养殖前景. 河北渔业, 1: 27—28
- 张晓光, 陈惠, 孙书清, 1998. 兴凯湖翘嘴红鲌人工受精卵发育初步观察. 水产学杂志, 11(2): 29—33
- 周剑, 陈先均, 2005. 翘嘴红鲌生物学特性及人工繁殖的初步研究. 四川农业科技, 1: 25—28
- 顾志敏, 朱俊杰, 贾永义等, 2008. 太湖翘嘴红鲌胚胎发育及胚后发育观察. 中国水产科学, 15(2): 204—214
- 倪勇, 伍汉霖, 2006. 江苏鱼类志. 北京: 中国农业出版社, 282—305
- Akiko M, Akane O, Yoshifumi O *et al*, 2011. Novel and conserved protein Macoilin is required for diverse neuronal functions in *Caenorhabditis elegans*. PLOS Genetics, 7(5): 1—14
- Georgas K, Rumballe B, Todd V M *et al*, 2009. Analysis of early nephron patterning reveals a role for distal RV proliferation in fusion to the ureteric tip via a cap mesenchyme-derived connecting segment. Dev Biol, 332(2): 273—286
- Halushka M K, Fan J B, Bentley K *et al*, 1999. Patterns of single nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood pressure homeostasis. Nat Genet, 22: 239—247
- Kuvbachieva A, Bestel A M, Tissir F *et al*, 2004. Identification of a novel brain-specific and Reelin-regulated gene that encodes a protein colocalized with synapsin. Eur J Neurosci, 20(3): 603—610
- Noah D, Chunshui Z H, Judit V *et al*, 2008. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. PNAS, 105(38): 10762—10767
- Strausberg R L, Feingold E A, Grouse L H *et al*, 2002. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. PNAS, 99(26): 16899—16903
- Tamura K, Dudley J, Nei M *et al*, 2007. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24: 1596—1599
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F *et al*, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25: 4876—4882
- Toshio O, Yutaka S, Tetsuo N *et al*, 2004. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. Nature Genetics, 36: 40—45
- Wang D G, Fan J B, Siao C J *et al*, 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. Science, 280: 1077—1082

## CLONING, TISSUE EXPRESSION AND SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM ANALYSIS OF *CULTER ALBURNUS* TMEM-57

QI Peng-Zhi<sup>1</sup>, GUO Bao-Ying<sup>2</sup>, XIE Cong-Xin<sup>1</sup>, WU Chang-Wen<sup>2</sup>,  
LU Shi-Min<sup>1</sup>, DUAN You-Jian<sup>1</sup>

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070; 2. National Research Centre of Mariculture Equipments and Engineering, Technology, Marine Science College of Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316004)

**Abstract** In this paper, a 2822bp full-length cDNA sequence of TMEM-57 gene from *Culter alburnus* was obtained with RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique. It consists of a 93bp 5' untranslated region (UTR), an 1998bp open reading frame (ORF) and a 731bp 3'UTR. The translated protein is composed of 665 amino acids. Neighbor-Joining (NJ) tree suggested that the TMEM-57 gene is highly conservative between species clustering the same species. After detected the gene expression quantity in tissues with real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR), expression quantity in the ovary is considered highest, then the heart and brain. Certain fragments of TMEM-57 are inspected for single nucleotide polymorphism (SNP) by sequencing of PCR production, eleven novel SNP loci are detected.

**Key words** *Culter alburnus*, TMEM-57, Real-time fluorescence quantitative PCR, Single nucleotide polymorphism