

·研究简报·

黄鳍 β -肌动蛋白基因的克隆及序列分析

李建林, 俞菊华, 唐永凯, 曹丽萍, 吴婷婷

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

摘要:采用 RT-PCR 和 RACE 法, 从黄鳍 (*Monopterus albus* Zuiewu) 肝脏中分离和克隆黄鳍 β -肌动蛋白 (actin) 基因。该基因 cDNA 全长 1 765 bp [不包括 poly(A)], 5' 端非翻译区 12 bp, 3' 端非翻译区有 625 bp [不包括 poly(A)], 阅读框 (Open reading frame, ORF) 1 128 bp, 翻译成 375 个氨基酸, 蛋白质分子量 41.77 kD。将所得序列与各种鱼、蛙、鸡、牛、鼠、人等的 β -肌动蛋白基因序列同源性分析显示, 核苷酸序列具有 68%—95% 的相似性, 氨基酸序列具有 97%—100% 相似性, 显示该基因在生物进化过程中的保守; 系统发育分析表明黄鳍 β -肌动蛋白基因与罗非鱼的亲缘关系最近。

关键词:黄鳍; β -肌动蛋白; cDNA 末端快速扩增法; 系统发育关系

中图分类号: Q959.482 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)02-0188-05

肌动蛋白是构成细胞骨架和肌小节的主要成分, 具有重要的生理功能, 几乎参与了真核细胞的所有生理过程^[1-3], 如细胞分裂、染色体运动、细胞器运动、细胞极化、胞质流动等。肌动蛋白是由多个基因组成的家族所编码, 由 375—377 个氨基酸残基组成, 分子量 42 kD 左右。高等动物细胞内的肌动蛋白根据等电点的不同可分为 α 、 β 和 γ 3 类。 β -肌动蛋白基因氨基酸编码区高度保守, 酵母和兔子肌肉的肌动蛋白的同源性达 88%, 原鸡、鼠、人 β -肌动蛋白氨基酸序列相似性 100%。 β -肌动蛋白除有基因序列高度保守的特征外, 还具有 mRNA 的表达数量高, 而且数量稳定, 几乎不随年龄产生变化的特点, 在测定某种 mRNA 的表达量时, 常采用 β -肌动蛋白 mRNA 作为内标^[4], 在核酸酶保护分析中也可作为外标^[5]。黄鳍 (*Monopterus albus* Zuiewu) 是硬骨鱼类合鳃目、合鳃科、黄鳍亚科的惟一代表种, 因其具有天然性逆转特性而受到众多研究者的关注^[6]。许多研究者正致力于研究有关黄鳍性别形成、转化的分子机制, 但有关黄鳍 β -肌动蛋白基因序列尚未见报道。研究黄鳍性别形成与性转相关酶类的表达特征需要可靠的特异内标引物, 为此, 本研究采用 RT-PCR 及 RACE 法, 分离、克隆黄鳍 β -肌动蛋白基因, 并进行序列分析, 旨在为进行定量 RT-PCR 提供可靠内标的基础数据, 提高内标引物设计的正确性和特异性, 同时也为今后进一步研究 β -肌动蛋白基因本身结构、功能和表达分析提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 黄鳍购自无锡市南桥菜市场, 共 5 尾, 体长 38—51.5 cm, 体重 45—175 g, 组织为肝脏。

1.1.2 主要试剂 抽提 RNA 用 Trizol Reagent (Promega), 反转录酶 M-MLV, RnaseH, Taq 酶, 胶回收试剂盒, 连接酶等均购自 TaKaRa; Taq 酶购自 Promega。

1.1.3 菌种和质粒 大肠杆菌 DH5 α 本实验室保存, pUCm-T 载体购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.1.4 引物 用于 PCR 反应的所有引物如下, 其碱基位置是根据作者登录 GenBank 序列 (GenBank accession number AY647143) 确定的。P1、P2 是根据已知鱼类 β -肌动蛋白的保守序列设计的一对引物; P3 是根据 P1、P2 分离的片段设计的用于 3'RACE 的特异引物; P4、P5 是根据 P1、P2 引物分离的片段设计的用于 5'RACE 的特异引物, 所有引物均由 TaKaRa 合成。

P1 碱基 502—518 5'-ccn tet acg agc gtt n -3';

P2 碱基 883—898 5'-tgg cgt acn ggt cct t -3';

P3 碱基 598—614 5'-cgt ggc tac tcc ttc ac -3';

P4 碱基 873—889 5'-ggc cct tac gga tgt cg -3';

P5 碱基 646—669 5'-gac gta gca cag ctt ctc ctt gat -3'。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的抽提 将黄鳍剪断颈椎, 取新鲜肝脏, 用 Trizol Reagent 根据使用说明抽提总 RNA。用变性琼脂糖凝

收稿日期: 2004-07-12; 修订日期: 2004-09-06。

基金项目: 中国水产科学研究院科研基金项目 (2003.8—2005.7); 无锡市自然科学基金 (CK03001)。

作者简介: 李建林 (1974—), 男, 助理, 从事鱼类遗传育种研究。E-mail: lij@ffrc.cn

通讯作者: 吴婷婷。E-mail: wutt@ffrc.cn

胶电泳溴化乙啶染色显示 28 s 和 18 s, 检测 RNA 的完整性。

1.2.2 RT-PCR 分离黄鳍 β -肌动蛋白基因

(1) 保守片段的分离 取 5 μ g 从肝脏抽提的总 RNA, 以 dT-Ap[dT-AP, 5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC(T)₁₆-3'] 为引物, 用 M-MLV 根据使用说明进行 RT 反应, 然后用 10% RT 液, 使用引物 P1 和 P2 扩增 β -肌动蛋白 400 bp 左右的序列。PCR 反应总体积 25 μ L, 其中含 1 $\times$ 反应缓冲液, 2 μ mol/L 氯化镁, 200 μ mol/L dNTP, 引物各 0.4 μ mol/L, 2.5 U Taq 酶。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。反应结束后用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 切下目的条带, 用胶回收试剂盒回收, 克隆后送测序。

(2) 3'RACE 方法 用 5 μ g 总 RNA 以 dTAp[dT-AP, 5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC(T)₁₆-3'] 为引物, 用 M-MLV 根据使用说明进行 RT 反应, 然后用 RT 液的 10%, 以 AP[AP, 5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3'] 和 P1 为引物进行 PCR, PCR 总体积 25 μ L, 反应体系同上, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存; 为提高扩增效率及扩增的特异性, 把上述 PCR 液稀释 10 倍, 取 2 μ L 作模板, 用引物 AP 和 P3 进行再扩增, 退火温度为 55 $^{\circ}$ C, 其他 PCR 反应条件不变, 扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 回收, 克隆, 送测序。

(3) 5'RACE 方法 原理参照文献[7-8], 用 5 μ g 总 RNA, 以 P2 为引物, 用 M-MLV 根据使用说明进行 RT 反应, 然后加 RNaseH, 分解 mRNA; 用 DNA 回收试剂盒(TaKaRa)回收 cDNA, 去除多余的 dNTP、引物等; 再用 TdT 酶在 cDNA 3' 端加 poly(A), 并用试剂盒回收加了 poly(A) 尾的 cDNA。以加 poly(A) 尾的 cDNA 为模板, 用 P4 及 dT-AP(同 3'RACE) 为引物, 进行 PCR 扩增, 退火温度为 52 $^{\circ}$ C, 反应体系、条件组成同 3'RACE; PCR 液稀释 10 倍, 取 2 μ L 为模板, 用 P5 及 AP, 进行 PCR 扩增, 退火温度为 58 $^{\circ}$ C, 反应体系、条件同上, PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 回收, 克隆, 送测序。

1.2.3 PCR 产物的克隆和鉴定 在 T4DNA 连接酶作用下, 将纯化的 DNA 片段连接到 pUCm-T 载体中, 构建 pUCm β -actin 重组质粒, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 经蓝白斑筛选重组子^[9], 筛选出的阳性克隆进行双酶切和 PCR 鉴定, 以确定质粒是否插入了目的片段。

1.2.4 序列测定、分析和系统树构建 序列测定由上海开瑞生物芯片科技股份有限公司测序。所得序列拼接、校正后用软件 DNATools 5.1 分析。与其他脊椎动物 β -肌动蛋白基因和氨基酸序列的同源性使用 ClustalW1.8^[10] 软件进行分析, 再用 PAUP(Phylogenetic Analysis Using Parsimony version 4.0, b2)^① 计算系统发育关系, 用 Neighbor-Joining 法, 重复 1 000 次, gap 处理为缺失, 在距离模式下, 用 Bootstrap 计

算各个分支的支持度, 最后用 Tree View 1.6 软件观看, 输出图形化的系统树。

2 结果

2.1 黄鳍 β -肌动蛋白基因的分离

取黄鳍肝脏的总 RNA, 进行 RT-PCR, 用引物 P1 和 P2 扩增出 400 bp 左右的条带, 将其插入质粒, 双酶切鉴定, 测序结果表明序列长 396 bp, 经 Blast 软件分析, 确定为 β -肌动蛋白基因。根据所得序列设计合成引物 P3, 用肝脏总 RNA 进行 3'RACE, 获得 1 150 bp 左右的 DNA 条带, 经插入质粒, 酶切鉴定, 送测序, 结果得到 1 168 bp 的序列。根据保守序列设计 5'RACE 引物 P4、P5。按照 5'RACE 实验程序, 结果获得 750 bp 左右 DNA 条带, 克隆后酶切鉴定, 送测序, 序列为 669 bp。把上述序列拼接得到黄鳍 β -肌动蛋白基因全序列(GenBank accession number AY647143)(图 1), 该 cDNA 总长 1 765 bp, 其中阅读框 1 128 bp, 编码 375 个氨基酸, 测算的蛋白质分子量为 41.77 kD; 5'非翻译区 12 bp; 3'非翻译区 625 bp(不包括 poly(A))。

2.2 序列分析

2.2.1 同源性比较 使用 ClustalW1.8 对 GenBank 中已发表的莫桑比克罗非鱼(AB037865.1)、鲑鱼(AF012125.1)、青鳉(D89627.1)、虹鳟(AF157514.1)、斑马鱼(AF025305.1)、鲫鱼(AB039726.2)、蛙(AY226144.1)、牛(AY141970.1)、原鸡(L08165.1)、鼠(X03672.1)、人(BC004251.1)等 11 种脊椎动物的 β -肌动蛋白基因序列及其推导的氨基酸序列进行同源性分析。结果显示, 黄鳍 β -肌动蛋白基因核苷酸序列与它们的同源性分别为 92%、89%、91%、81%、90%、68%、83%、77%、77%、76% 和 76%; 所推导的氨基酸序列同源性分别为 100%、99%、98%、98%、99%、98%、98%、97%、98%、98%、98%。

2.2.2 系统发育分析 用 PAUP 软件构建 β -肌动蛋白的系统发育树。由于 β -肌动蛋白氨基酸序列同源性高度保守, 很难计算出黄鳍与其他脊椎动物 β -肌动蛋白的系统发育关系。图 2 是在上述比较的基础上, 用 β -肌动蛋白核苷酸构建的系统树。由发育树可以看出黄鳍与罗非鱼 β -肌动蛋白基因的亲缘关系最近, 鱼类 β -肌动蛋白基因形成一个独立的分化群, 说明鱼类 β -肌动蛋白基因起源于一个共同祖先。另外, 从图 2 可以看出, 脊椎动物 β -肌动蛋白聚成 3 个分支, 两栖类和鸟类在第 1 分支上, 鱼类在第 2 分支上, 哺乳类在第 3 分支上, 这种系统发育关系与传统的分类基本一致, 因此从 β -肌动蛋白基因的进化中我们也能看出脊椎动物的进化规律, 如果从分子水平来研究生物进化, 肌动蛋白是一个非常好的工具^[11]。

① Swofford D L PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods[Z]. Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1998.

1	GAA AGT TCA GCC ATG GAA GAC GAA ATC GCC GCA CTC GTT GTT GAC AAT GGA TCT GGT ATG	61
1	M E D E I A A L V V D N G S G M	16
62	TGC AAA GCT GGA TTT GCT GGA GAC GAT GCA CCC GGT GCT GTC TTC CCC TCA ATT GTT GGT	121
17	C K A G F A G D D A P R A V F P S I V G	36
122	CGC CCC AGG CAT CAG GGA GTG ATG GTG GGT ATG GGC CAG AAG GAC AGC TAT GTT GGT GAT	181
37	R P R H Q G V M V G M G Q K D S Y V G D	56
182	GAA GCC CAG AGC AAG AGA GGT ATC CTG ACC CTG AAG TAC CCC ATT GAG CAC GGT ATT GTG	241
57	E A Q S K R G I L T L K Y P I E H G I V	76
242	ACC AAC TGG GAT GAC ATG GAG AAG ATT TGG CAT CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG AGA GTC	301
77	T N W D D M E K I W H H T F Y N E L R V	96
302	GCC CCT GAA GAG CAC CCT GTC CTG CTC ACA GAG GCT CCT CTG AAC CCC AAA GCC AAC AGG	361
97	A P E E H P V L L T E A P L N P K A N R	116
362	GAG AAG ATG ACC CAG ATC ATG TTC GAG ACC TTC AAC ACC CCT GCC ATG TAC GTT GCC ATC	421
117	E K M T Q I M F E T F N T P A M Y V A I	136
422	CAG GCT GTG CTG TCC CTG TAC GCC TCT GGT CGT ACC ACC GGA ATT GTC ATG GAC TCC GGT	481
137	Q A V L S L Y A S G R T T G I V M D S G	156
482	GAT GGT GTG ACC CAC ACA GTG CCC ATC TAT GAG GGG TAC GCC CTG CCC CAC GCC ATC CTG	541
157	D G V T H T V P I Y E G Y A L P H A I L	176
542	CGT CTG GAC TTG GCC GGT GAC CTC ACA GAC TAC CTC ATG AAG ATC CTG ACA GAG <u>CGT</u>	601
177	R L D L A G R D L T D Y L M K I L T E R	196
602	GGC TAC TCC TTC ACC ACC ACA GCT GAG AGG GAA ATT GTG CGT GAC ATC AAG GAG AAG CTG	661
197	G Y S F T T T A E R E I V R D I K E K L	216
662	<u>TGC TAC GTC</u> GCC CTG GAC TTC GAG CAG GAG ATG GGC ACT GCT GCC TCT TCC TCC TCC CTG	721
217	C Y V A L D F E Q E M G T A A S S S S L	236
722	GAG AAG AGC TAT GAG CTG CCT GAT GGG CAG GTC ATC ACC ATT GGC AAT GAG AGG TTC CGT	781
237	E K S Y E L P D G Q V I T I G N E R F R	256
782	TGC CCA GAG GCC CTC TTC CAG CCT TCT TTC CTT GGT ATG GAG TCC TGC GGA ATC CAT GAG	841
257	C P E A L F Q P S F L G M E S C G I H E	276
842	ACC ACC TAC AAC AGC ATC ATG AAG TGT GAT GTC GAC ATC CGT AAG GAC CTG TAT GCC AAC	901
277	T T Y N S I M K C D V D I R K D L Y A N	296
902	ACT GTG CTG TCT GGT GGT ACC ACC ATG TAC CCT GGC ATC GCT GAC AGG ATG CAG AAG GAG	961
397	T V L S G G T T M Y P G I A D R M Q K E	316
962	ATC ACA GCT CTG GCC CCA TCC ACC ATG AAG ATC AAG ATC ATT GCC CCA CCT GAG CGT AAA	1021
317	I T A L A P S T M K I K I I A P P E R K	336
1022	TAC TCT GTC TGG ATC GGA GGC TCC ATC CTG GCT TCT CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG TGG	1081
337	Y S V W I G G S I L A S L S T F Q Q M W	356
1082	ATC AGC AAG CAA GAA TAC GAT GAG TCC GGC CCC TCC ATC GTC CAC CGC AAA TCC TTC TAA	1141
357	I S K Q E Y D E S G P S I V H R K C F *	375
1142	ACA GAC TGT TCC TCC TTC CCC TCC CCA GCC AAA CAC AAA CAT CTT CAG CTC TGT GCA AAA	1201
1202	CCA CAT CAT ACA TTG TCA TAC ACT CAG GCG CAG AGC CTA GAC GAC CAA CTC ATT GGC ATG	1261
1262	GCT TCA GTT ATT TTT GGC GCT TGA CTC AGG ATT TAA AAA AAA CTG GAA CAA TGA AGG AGA	1321
1322	CAG TAA TGT TTT GGC TAG GTT TAA GAA ACG CAC CCC AGG GTT CTG CAG TTG CAT CTG GGA	1381
1382	CTT AAA TGT ACA TTT TGT TTT TCT TTT GAG TCA TTC CAA ATG TTT AAC TGC GTT GCT CAG	1441
1442	ACA CAA TTC CAA ATG TTA ACT GCA TTG TTC AGA CAC GTA TTT GCC TCT GTG AAG GCT GCC	1501
1502	CAG TGG TTG GCG CAT ACT TAA ACA TGG TTG TAG TAT GGC TTG TGT GTA AAT TAT GTC TGG	1561
1562	GTT TTT TGT ACG TTC AGC CTT AAA TAC CTT TGG TCC TGT TTC TTT TTT GTT ATG CAA AAC	1621
1622	CCA ATC ATG ACC TCT TCC CCT GTT GGA GGC TCA TCC TGG GGT GGT GGG GCA AGG GGT TTG	1681
1682	ATG GAT GGG GTA ACA TAG GGT GCC AGA CCG GTG GGG CCA ACC TGT ACA CTG ACT ATG ATC	1741
1742	CAA TAA A GT GCA CAT GCG TTC CGA C	1765

图1 黄鲢β-肌动蛋白基因全长cDNA序列和编码的氨基酸序列

箭头表示PCR引物序列,3'端poly(A)信号(AATAA)用阴影表示。

Fig.1 Nucleotide and predicted amino acid sequence of rice field eel β-actin cDNA

Nucleotide sequence of primers for PCR are showed by arrows:

the polyadenylation signal(AATAA) in the 3'-untranslated regions are shaded.



图2 β -肌动蛋白核苷酸系统树

用PAUP4.0软件Njbootstrap方法构建,

分支上的数字代表bootstrap值。

Fig.2 Phylogenetic tree of β -actin gene

The consensus tree was constructed by neighbor-joining bootstrap using PAUP4.0. The number is the bootstrap value.

3 讨论

黄鳝 β -肌动蛋白基因与其他脊椎动物 β -肌动蛋白基因相似性在70%以上,阅读框核苷酸序列相似性在95%以上,这表明 β -肌动蛋白基因在生物进化过程中相当保守。 β -肌动蛋白基因3'端非翻译区变异较大,该区含有控制mRNA定位和多聚腺苷酸化的信号,及一些控制mRNA稳定、翻译起始的信号,起着调控翻译产物,控制翻译时间和地点的作用^[12],同时反映了该基因在时间和空间表达上的特异性^[13]以及基因进化的时间进程。

从该基因推导的氨基酸序列与其他脊椎动物相比,发现其具有更高的保守性,达97%~100%。这种高度的保守性与Perler^[14]等的研究结果相一致,即生物肌动蛋白氨基酸残基变化1%约需1亿年,这暗示肌动蛋白在生物进化过程中受到较大的选择压力,在生物体生命过程中执行着重要的生物学功能。同时由于 β -肌动蛋白分子高度保守性,很难使用该氨基酸序列分析系统发育关系。随着越来越多的肌动蛋白基因的克隆和序列测定,对基因本身结构、功能和表达的研究也逐步深入,这将更利于了解肌动蛋白的保守性和变异性与生命起源和进化的关系。

参考文献:

- [1] Welch M D, Holtzman D A, Drubin D G. The yeast actin cytoskeleton[J]. Cur Opin Cell Biol, 1994, 6: 110-119.
- [2] Shterline P, Sparrow J. Protein Profile, Actin [M]. London: Academic Press, 1994. 1-62.

- [3] Staiger C J, Schliwa M. Actin localization and function in higher plants[J]. Protoplasma, 1987, 141: 1-12.
- [4] 贺淹才. 肌动蛋白和肌动蛋白基因的研究进展[J]. 生命的化学, 2002, 3(22): 248-250.
- [5] Krussel J, Ström C, Rubio M C, et al. Expression of interleukin-1 (IL-1) system mRNAs in single blastomeres from human preimplantation embryos[J]. Human Reproduction, 1998, 13: 2206-2211.
- [6] Zhou R J, Guo Y Q, Cheng H H, et al. Comparative three fish of sex determining region Y (SRY) and SRY box genes[J]. Acta Zool Sin, 1997, 43(2): 192-196.
- [7] Frohman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligo-nucleotide primer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 8998-9002.
- [8] 俞菊华, 夏德全, 杨弘, 等. RACE法分离团头鲂生长抑制素全长cDNA及其序列测定[J]. 水产学报, 2003, 27(6): 533-539.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning[M]. Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Thompson J D, Higgins D G, Gibson J F. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22: 4673-4680.
- [11] 李园莉, 江元清, 赵武玲, 等. 谷子肌动蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 植物学通报, 2002, 19(3): 310-316.
- [12] Kwon Y K, Hecht N B. Cytoplasmic protein binding to highly conserved sequence in the 3' untranslated region of mouse protamine 2 mRNA, a translationally regulated transcript of male germ cells[J]. Proc Acad Sci USA, 1991, 88(9): 3584-3588.
- [13] Meagher R B. Divergence and differential expression of actin gene families in plant[J]. Int Rev Cytol, 1991, 125: 139-163.
- [14] Perler F, Efstratiadis A, Lomedico P, et al. The evolution of genes: the chicken preproinsulin gene [J]. Cell, 1980, 20: 555-566.
- [15] 周海飞, 赵武玲, 阎隆飞. 玉兰肌动蛋白基因的克隆与序列分析[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(3): 274-278.
- [16] 刘美德, 洪晓月, 杜建光, 等. 褐飞虱肌动蛋白基因3'末端克隆与测序[J]. 昆虫学报, 2003, 46(4): 540-544.
- [17] 李园莉, 江元清, 赵武玲, 等. 向日葵肌动蛋白基因的cDNA克隆及进化分析[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(1): 67-71.

(英文摘要见187页 For English see page 187)