

鱼类 DNA 聚合酶 δ P12 亚基 cDNA 克隆与序列分析

殷志新, 黄仙德, 何建国

(中山大学 生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要:从斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)白细胞 cDNA 文库随机挑选克隆, 测定表达序列标签(ESTs), 利用 BLASTX 程序与 GenBank 中的序列进行比较, 得到了 1 个 cDNA, 其编码蛋白质与人类 DNA 聚合酶 δ (pol δ)的 P12 亚基有 47.7% 的同源性, 推测它为斜带石斑鱼 pol δ 的 12 kD 小亚基的 cDNA, 所编码的蛋白质命名为 P12。该 cDNA 全长 619 bp, 含 1 个 330 bp 的开放阅读框, 编码 109 个氨基酸残基的蛋白质。序列对比表明, 斜带石斑鱼的氨基酸序列与人、大鼠、小鼠、拟南芥和裂殖酵母的 pol δ 小亚基有同源性, 同时与斑马鱼 EST CK680540 的编码序列有 66.6% 的同源性。用 RT-PCR 检测该基因在石斑鱼各组织的表达情况, 发现在脾、肝、脾、全血、胃和后肾有表达, 而在肠、心脏、脑和头肾未检测到。[中国水产科学, 2006, 13(3): 466-470]

关键词: DNA 聚合酶 δ (pol δ); P12 亚基; 斜带石斑鱼; RT-PCR

中图分类号: Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)03-0466-05

DNA 聚合酶(DNA polymerase, pol)在真核细胞的 DNA 复制和修复中起重要作用。其中, pol δ 最早是由 Byrnes 等于 1976 年从牛骨髓中分离出来^[1]。1994 年 Waga 等^[2]在 SV40 DNA 体外复制中, 证实 pol δ 在哺乳动物 DNA 复制中起关键作用。在复制过程中, pol δ 及相关酶催化引物 RNA 与模板 DNA 形成复合物, 而后 pol δ 催化前导链和冈崎片断的延长^[2-4]。进一步的研究表明, pol δ 在端粒酶介导的端粒延长^[5]、细胞周期控制^[6]、DNA 错配修复^[7]、双链断裂修复^[8-9]、核苷酸剪切修复^[10]、旁路修复 DNA 损伤^[8, 11-12]中发挥作用。

pol δ 是多亚基聚合体, 其亚基组成在不同真核生物中存在差异。已发现从酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)分离出的 pol δ 含 3 个亚基(125 kD、58 kD 和 55 kD), 分别由 POL3、POL31 和 POL32 基因编码^[13-14], 而裂殖酵母(*S. pombe*) pol δ 则含 4 个亚基, 即大分子催化亚基 Pol3(125 kD)和 3 个小分子亚基 Cdc1(55 kD)、Cdc27(54 kD)和 Cdm1(22 kD)。前 3 个亚基分别与酿酒酵母的 Pol3、Pol31 和 Pol32 同源, 而编码小亚基 Cdm1 的基因在酿酒酵母中无同源基因^[15]。哺乳动物的 pol δ 最初纯化出 2 个亚基(125 kD 和 50 kD)^[16]。其中 P125 亚基与酿酒酵母的 POL3 和裂殖酵母的 Pol3

同源, 而 P50 亚基与 POL31 和 Cdc1 同源。近几年的研究认为, 哺乳类 pol δ 可能由类似裂殖酵母 pol δ 的 4 个亚基组成, 新发现的亚基有 P66 和 P12。P66 与 POL32 和 Cdc27 同源, 而 P12 与裂殖酵母的 Cdm1 同源^[17]。

关于 pol δ 的第 4 个亚基, 裂殖酵母的 Cdm1 亚基根据氨基酸数目预测其分子量为 18.5 kD, 在凝胶电泳中得到的该蛋白质的分子量为 22 kD。人的 P12 亚基的分子量为 12.4 kD^[18]。

pol δ P12 亚基的具体功能, 现在还不十分清楚。Xie 等^[19]用含 P125 和 P12 亚基基因的载体共转染 SF9 细胞, 后将细胞裂解液进行凝胶过滤层析, 发现这 2 种亚基可共同洗脱, 说明 P12 和 P125 两个亚基可相互作用。Product 等^[20]用重组表达的人 pol δ 的各亚基构建 pol δ 。结果表明, P125、P50 和 P66 三亚基可形成稳定的复合物, 并具有 pol δ 的活性。但活性比 4 个亚基组成的重组酶低 15 倍。在这三亚基的复合物中加入 P12 亚基, 可增强三亚基重组酶的活性 4 倍, 而给四亚基酶加入 P12, 则无这样的效果。此结果提示, P12 是构建有完全活性的重组 pol δ 酶所必需的。

在鱼类, Sharova 等从泥鳅的卵中提取出 pol δ , 并认为其中的 120~130 kD 多肽是催化亚基^[21]。但鱼类 pol δ 的其他亚基组成未见报道。

收稿日期: 2005-05-23; 修订日期: 2005-08-18。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30300266); 国家“863”高技术研究发展计划项目(2001AA601010); 广东省科技计划重点引导项目(2004B20301008)。

作者简介: 殷志新(1970-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事水生经济动物病害及分子生物学研究。E-mail: yinzhixin@tmm.com

通讯作者: 何建国。Tel: 020-84110976; Fax: 020-84036215; E-mail: hsbre05@msu.edu.cn

本研究介绍了从斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 白细胞 cDNA 文库中分离出 1 个基因, 编码一种新蛋白, 与人类 pol δ P12 亚基有很高的同源性, 推测它为斜带石斑鱼 pol δ 的 12 kD 小亚基的 cDNA, 所编码的蛋白质命名为 P12。

1 材料和方法

1.1 材料

斜带石斑鱼白细胞 cDNA 文库, 本室构建^[22]; 健康斜带石斑鱼 3 条, 体质量 (230 ± 17) g, 取自广东湛江恒兴集团养殖鱼排。取各个组织, 剪碎后放于 RNAlater 液中 (Ambion 公司), 冰浴中带回实验室; 扩增 pol δ P12 cDNA 片断所用引物 (F1: 5'-CT-GCTGGAGCTTGTATTG-3'; F2: 5'-GTGGTG-CAACT GCAAGGAAA-3') 和扩增 α -actin 片断所用引物 (α -actin_F: 5'-AGT CCC CTC CCC CGA AAC AC-3'; α -actin_R: 5'-GGG CCC ACC AGA GAA TAA ACC TT-3') 由上海博亚公司合成。

1.2 方法

1.2.1 石斑鱼 pol δ P12 亚基 cDNA 的克隆 从斜带石斑鱼白细胞 cDNA 文库中随机挑取克隆, 测定表达序列标签 (ESTs)。EST 序列用 NCBI 的 BLASTX 程序与 GenBank 数据库的序列进行比较。获得 1 个克隆, 其编码序列与人 pol δ P12 亚基序列有较高的同源性。将其编码氨基酸序列用 BLASTP 程序与蛋白质数据库进行比较, 发现它含有 DNA

pol δ 第四亚基的保守结构域^[23]。用 LOCtree 程序预测其细胞内的定位, 推测其可能定位于核内, 可与 DNA 结合^[24]。因而推测该 cDNA 为斜带石斑鱼 pol δ P12 亚基的 cDNA。

1.2.2 氨基酸序列的多重对比 采用 Lasergene 公司 DNASTAR 软件包中 MegAlign 程序 (4.01 版) 进行, Clustal W 模式。

1.2.3 RT-PCR 检测 pol δ P12 亚基的表达 取石斑鱼的腮、肝、脾、全血、肠、胃、心、脑、头肾和后肾, 按 TRIZOL 试剂说明书提取各组织的总 RNA, 逆转录按说明书用随机引物进行。扩增 pol δ P12 序列的 PCR 条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 36 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$, 35 s, 54 $^{\circ}\text{C}$, 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min。72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min。扩增 α -actin 片断的 PCR 条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 40 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 40 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min。最后 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min。PCR 产物经回收纯化后, 测序鉴定。

2 结果

2.1 pol δ P12 的 cDNA 序列

该 cDNA 长 619 bp, 最长的开放阅读框 330 bp, 编码一个 109 个氨基酸残基的蛋白质 (图 1)。在 polyA 尾上游 19 bp 有 polyA 识别信号 (AATAAA)。通过 www.expasy.ch 网站的 PI/MW 程序计算该蛋白质的分子量为 12.8 kD, 等电点为 9.2。该序列已上传至 GenBank, 序列号为 AY790630。

1	GG AAG AAG AAG ACA GCG TCG TCG TCA TTG TTT TGG TCG ACT GGT TTT	47
48	TCT GCA GAC TGA ATG AAG AGA AAA CAT TTT GAA CTG GGC GAT ACA TCT	95
96	GCT CGA GCT TGT ATT GGT TGA ATA ACG AGA TCA GTC ACC ATA ACA ACC	143
1		
144	AAG CGC GGA CTG ATA ACT GAT TCA TTC AAG GTG GTG AAG AGA GCA AGG	191
4	K R G L I T D S F K V V K R A R	19
192	AGG GGG ACG AAA CGA GCG AAG ACG OCT OCT TCT OCT OCT CCG CCA GAG	239
20	R G T K R A K T P P S P P P P E	35
240	AAA GAA GCT GAA ACT AAA ACC ATC CGA GAG GAG GAG CTG GAG ACG CTC	287
36	K E A E T K T I R E E E L E T L	51
288	AGA CAT TTT GAT CTG GAC TGG AGA TTT GGG OCT TGC ACA GGT ATC AGC	335
52	R H F D L D W R F G P C T G I S	67
336	AGG TTG CAG AGA TGG GAG AGA GCA AAG CTT CAT GGT CTG AGC CCA OCT	383
68	R L Q R W E R A K L H G L S P P	83
384	GAG GAG ATC AGA GAC CTG CTG CTG CAA ACA AAC ACT GAC CCC GAG TAC	431
84	E E I R D L L L Q T N T D P E Y	99
432	AGC TGG AGC CTA TGG AGC GAA TAC OCT TTG TGA GGA AGA CAT OCT AAG	479
100	S W S L W S E Y P L *	110
480	ACA CAG AAG AAT GAC AGA GCA TCC AGT TGT GTG TGT TTT TTT CTT GCA	527
528	GTT GCA CCA CAC TGC TTC TGC ACA GTC TAC TAC ATT TTT AAT AAA AAA	575
576	GAA GTT TGG ATA ATT TAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA	619

图 1 石斑鱼 DNA 聚合酶 δ P12 亚基核苷酸序列及预测的氨基酸序列

注: 下划线所示为引物 F1 和 F2 的结合位点, 该引物对用以扩增转录区域; 起始和终止密码子用粗体字母表示; PolyA 信号 AAT AAA 以斜体字母表示。

Fig.1 Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of P12 subunit of grouper DNA polymerase δ

Note: Binding sites for primers F1 and F2 are underlined. Primer F1 and F2 are for the amplification of transcription regions. The start and stop codons are shown in bold letters. The polyadenylation signal is shown in italic letters.

2.2 斜带石斑鱼与其他物种 pol δ P12 亚基的序列对比

将斜带石斑鱼 pol δ P12 亚基 cDNA 用 BLASTN 程序与 GenBank 的 EST 库对比,发现 1 个同源性高的斑马鱼 (*Danio rerio*) 的 EST (CK680540), 它们编码蛋白质的序列同源性 66.1%, 推测应是斑马鱼的 pol δ P12 亚基。用 DNASTAR 软件中的 MegAlign 的 ClustalW 方法进行序列对比,推测的石斑鱼与人、小鼠、大鼠、拟南芥、裂殖酵母的 pol δ P12 亚基和斑马鱼 EST

CK680540 的氨基酸序列比较如图 2。斜带石斑鱼 pol δ P12 与斑马鱼 CK680540 的一致性最高。与其他脊椎动物该蛋白的一致性在 38.3% 以上(与人、小鼠、大鼠的一致性分别为 47.7%、43.9%、38.3%),与拟南芥和酵母中该蛋白的一致性为 26.6%。脊椎动物类与酵母和拟南芥等相比,在 C 端一半的相似性较高,而在 N 端的一半的相似性较低。根据这些结果,推测鱼类 pol δ 中,也可能存在 4 个亚基的结构,总结如表 1。更科学的论断还需更深入地进行研究。

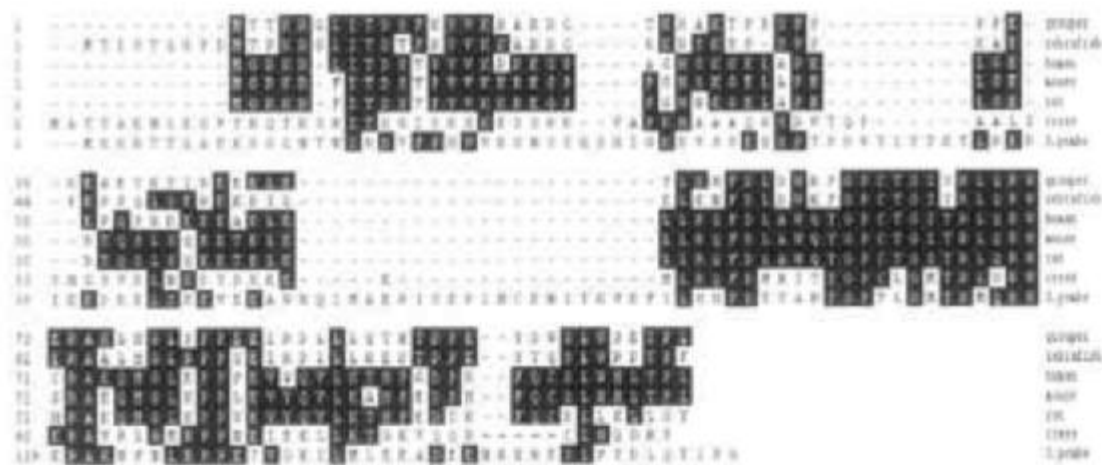


图 2 斜带石斑鱼与其他物种 pol δ 12 kD 亚基及斑马鱼 EST CK680540 翻译序列的比较

注:序列号:人, Q9HCU8; 小鼠, NP_081472; 大鼠, XP_341982; 拟南芥, NP_563854; 裂殖酵母, NP_595948。

Fig.2 Comparison of the grouper pol δ P12 subunit with the fourth subunits of other known pol δ and the coding sequence of zebrafish EST CK680540

Note: Accession Numbers: human, Q9HCU8; Mouse, NP_081472; Rat, XP_341982; Thale cress, NP_563854; *Schizosaccharomyces pombe*, NP_595948.

表 1 几种生物 pol 聚合酶 δ 的亚基组成
Tab.1 Pol δ subunits in different species

亚基 Subunit designation	裂殖酵母 <i>S. pombe</i>	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	哺乳动物 Mammals	鱼类 Fish	功能 ^a Comments ^a
A	Pol3	Pol3p	P125	120 ~ 130 kD ^b	催化亚基; 与 B 亚基相互作用 Catalytic subunit; interacts with B-subunit
B	Cdc1	Pol31p	P50/p55	未知 Unknown	与催化亚基和 C 亚基作用 Interacts with catalytic subunit and C-subunit
C	Cdc27	Pol32p	P66	未知 Unknown	与 B 亚基和增殖细胞核抗原(PCNA)作用 Interacts with B-subunit and with PCNA
D	Cdm1	—	P12	P12 ^c	与 A 和/或 B 亚基作用 Interacts with A-and/or B-subunit

注: a: 本表除鱼类部分引自 Mac Neill 等 2001; b: 来源于 Sharova 等 2001; c: 来源于本文及斑马鱼 EST CK680540。

Note: a: from Mac Neill et al. 2001; b: from Sharova et al. 2001; c: from this paper and zebrafish EST CK680540.

2.3 pol δ P12 亚基 cDNA 的表达

RT-PCR 分析 pol δ P12 的表达结果如图 3。以 PCR 扩增产物长度为 260 bp 的 α -actin 为内对照,在腮、肝、脾、全血、胃和后肾可检测到其转录产物,而在肠、心、脑和头肾未检测到。



图3 斜带石斑鱼 pol δ P12 亚基的 RT-PCR 结果分析
Fig.3 RT-PCR analysis of grouper pol δ P12 subunit cDNA

3 讨论

本研究通过构建斜带石斑鱼 cDNA 文库及随机测序,在鱼类首次克隆了 pol δ 的第 4 个亚基 cDNA,并通过 RT-PCR 方法,证实了该亚基 cDNA 确实在一些组织内进行了转录。根据这些结果,作者推测,鱼类的 pol δ 也可能与哺乳类一样,由 4 个亚基构成。当然这有待对鱼类 pol δ 其他亚基的研究工作验证。

pol δ 在真核生物 DNA 复制、损伤修复、细胞周期调控等方面发挥作用,本研究的 RT-PCR 的结果显示,在腮、肝、脾、血细胞、胃和后肾中有转录,而在肠、心脏和头肾未见到转录。其具体表达情况及原因还需进一步的研究证实。

pol δ 含有多个亚基,目前除了对催化亚基的功能略有了解以外,别的亚基的功能尚未清楚。同时关于 pol δ 全酶的亚基组成也有争议。本研究报道了鱼类 pol δ 第四亚基,为鱼类 pol δ 的组成、功能、进化和比较研究提供了参考依据。

参考文献:

- [1] Byrnes J J, Downey K M, Black V L, et al. A new mammalian DNA polymerase with 3' to 5' exonuclease activity: DNA polymerase delta[J]. Biochemistry, 1976, 15(13):2 817-2 823.
- [2] Waga S, Bauer G, Stillman B. Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors[J]. J Biol Chem, 1994, 269:10 923-10 934.
- [3] Melendy T and Stillman B. Purification of DNA polymerase delta as an essential simian virus 40 DNA replication factor[J]. J Biol Chem, 1991, 266:1 942-1 949.

- [4] Eki T, Matsumoto T, Murakami Y, et al. The replication of DNA containing the simian virus 40 origin by the monopolymerase and dipolymerase systems[J]. J Biol Chem, 1992, 267: 7 284-7 294.
- [5] Dinde S J, Gottschling D E. Telomerase-mediated telo-complex and the Tefp function in a single pathway for telomere alpha and delta[J]. Cell, 1999, 99:723-733.
- [6] Francesconi S, Park H, Wang T S. Cell cycle expression of two replicative DNA polymerases alpha and delta from *Saccharomyces pombe*[J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21:3821-3828.
- [7] Longley M J, Pierce A J, and Modrich P. DNA polymerase [delta] is required for human mismatch repair in vitro[J]. J Biol Chem, 1997, 272,10 917-10 921.
- [8] Giot L, Charret R, Simon M, et al. Involvement of the yeast DNA polymerase delta in DNA repair in vivo[J]. Genetics, 1997, 146(4): 1 239-1 251.
- [9] Holmes A M, Haber J E. Double-strand break repair in yeast requires both leading and lagging strand DNA polymerases[J]. Cell, 1999, 96: 415-424.
- [10] Alounsekhs A, Biggerstaff M, Shivji, M K, et al. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components[J]. Cell, 1995,80: 859-868.
- [11] Huang M E, de Calignon A, Nicolas A, et al. Pol32, a subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase δ , defines a link between DNA replication and the mutagenic bypass repair pathway[J]. Current Genetics, 2000, 38:178-187.
- [12] Harasaka L, Unk I, Johnson R E, et al. Roles of yeast DNA polymerases delta and zeta and of Rev1 in the bypass of abasic sites[J]. Genes Development, 2001,15:945-954.
- [13] Gerik K J, Li X, Puata A, et al. Characterization of the two small subunits of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase delta[J]. J Biol Chem, 1998, 273: 19 747-19 755.
- [14] Burgers P M, Gerik K J. Structure and proximity of two forms of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase delta[J]. J Biol Chem, 1998, 273: 19 756-19 762.
- [15] Reynolds N, Watt A, Fantes P A, et al. Cdn1, the smallest subunit of DNA polymerase δ in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, is non-essential for growth and division[J]. Current genetics, 1998,34: 250-258.
- [16] Lee M Y, Tan C K, Downey K M, et al. Further studies on calf thymus DNA polymerase delta purified to homogeneity by a new procedure[J]. Biochemistry, 1984, 23(9):1 906-1 913.
- [17] Hughes P, Trentner I, Ducoux M, et al. Isolation and identification of the third subunit of mammalian DNA polymerase delta by PCNA-affinity chromatography of mouse FMD cell extracts[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27: 2 108-2 114.
- [18] 程云, 梁念慈. 真核生物 DNA 聚合酶 δ 的研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2004, 25(1): 55-58.
- [19] Xie B, Macdon N, Liu L, et al. Reconstitution and characterization of the human DNA polymerase delta four-subunit holoenzyme[J]. Biochemistry, 2002, 41: 13 133-13 142.

- [20] Poduct V N, Chang L S, Dianov G L, et al. Reconstitution of human DNA polymerase δ using recombinant baculoviruses[J]. J Biol Chem, 2002, 277(6): 3 894–3 901.
- [21] Sharova N P, Dimitrova D D, Abramova E B, et al. Identification of DNA polymerase delta in eggs of a teleost fish (lanch)[J]. Biochemistry (Moscow), 2001, 66(2): 225–231.
- [22] Yin Z X, He J G, Deng W X, et al. Molecular cloning, expression of the goose-type lysozyme cDNA from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*), and the lytic activity of its recombinant protein[J]. Dis Aquat Organ, 2003, 55: 117–123.
- [23] Marchler-Bauer A, Anderson J B, Cherukuri P F, et al. "CDD: a Conserved Domain Database for protein classification." [J]. Nucleic Acids Research, 2005. 33:D192–196.
- [24] Nair R, Rost B. Mimicking cellular sorting improves prediction of Subcellular Localization[J]. J Mole Biol, 2005, 348(1): 85–100.
- [25] MacNeill S A, Boldacci G, Burgers P M, et al. A unified nomenclature for the subunits of eukaryotic DNA polymerase delta[J]. TRENDS in Biochemical Sciences, 2001, 26(1), 16–17.

Molecular cloning and analysis of a P12 subunit cDNA of fish DNA polymerase

YIN Zhi-xin, HUANG Xian-de, HE Jian-guo

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) leukocyte cDNA library was constructed and the expressed sequence tags (ESTs) were selected and sequenced. The ESTs were compared with those in GenBank Database using BLASTX program. One of the sequences showed 47.7% identity to human pol δ P12 subunit and was regarded as pol δ P12 subunit of orange-spotted grouper. The putative encoding protein was designated P12. The isolated cDNA from orange-spotted grouper was 619 bp in length. The longest open reading frame was 330 bp in length and encoded a protein of 109 amino acid residues. The sequence alignments among pol δ P12 of orange-spotted grouper and human, mouse, rat, *Arabidopsis thaliana* and budding yeast showed significant similarity. With RT-PCR, the pol δ P12 subunit mRNA transcripts were detected in gill, liver, spleen, blood cells, stomach, posterior kidney of *E. coioides*, but not in the intestine, heart, brain and anterior kidney. It is the first report of the pol δ P12 subunit in fish. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3): 466–470]

Key words: DNA polymerase (pol) δ ; P12 subunit; orange-spotted grouper; RT-PCR

Corresponding author: HE Jian-guo. E-mail: hbro05@znu.edu.cn