

草鱼线粒体细胞色素 b 基因的克隆与序列分析

叶 星, 白俊杰, 劳海华, 简 清, 罗建仁

(中国水产科学研究院 珠江水产研究所,
农业部热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东 广州 510380)

摘 要:用 DNA Extraction Kit 提取草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)肝脏的总 DNA, 合成特异引物, 进行 PCR 扩增。扩增产物经琼脂糖电泳检测、纯化后克隆到 pGEM-T easy vector system 的 T 载体上, 筛选转化子, 提取质粒, 酶切鉴定。重组质粒序列测定的结果显示克隆了草鱼线粒体细胞色素 b(cyt b)基因 1 140 个碱基及两侧部分序列共 1 254 bp。用 DNA 分析软件 Vector NTI 6.0 比较草鱼与 GenBank 中 18 种鱼类 cyt b 的序列, 显示草鱼与它们的 cyt b 基因具有较高的同源性; 根据草鱼与这 18 种鱼的 cyt b 基因序列同源性所建立的进化树, 与传统的分类地位基本吻合。

关键词:草鱼; 线粒体; 细胞色素 b; 核酸序列

中图分类号:Q959.468

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2002)03-0193-05

多年来, 病害特别是病毒性和细菌性病害一直困扰着草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)养殖业。目前使用的草鱼细菌性疾病灭活组织浆疫苗, 以及针对病毒性出血病的病毒灭活细胞疫苗和减毒细胞疫苗等对草鱼的病害预防控制起到了一定作用^[1]。开展草鱼主要病原体的分子基础研究, 可推进草鱼病害防治进程。

线粒体是一种具有半自主性的细胞器, 是细胞进行呼吸活动、产生能量的重要场所^[2]。细胞色素 b(cytochrome b, 简称 cyt b)位于线粒体内膜磷脂双层中, 是参与氧化磷酸化合成 ATP 过程电子传递链中的重要物质, 也是线粒体自身编码的为数不多的功能蛋白之一, 其转录和翻译均在线粒体中进行^[3]。cyt b 基因的进化速度适中, 近年来被广泛应用于两栖类、爬行类、鱼类等的系统发育、种类鉴别等的研究^[4-7]。最新的研究表明, 哺乳类的有些疾病与 cyt b 基因上某些碱基的缺失或突变有关; cyt b 基因的 mRNA 的表达量的增减与机体某些器官的

功能状况有关^[8], 提示 cyt b 基因在机体的正常代谢过程中的重要作用。为此对草鱼线粒体 cyt b 基因进行克隆和序列分析, 可为下一步研究草鱼线粒体基因的分子结构及基因表达与正常生理功能及疾病发生的关系打下基础。目前关于鱼类线粒体 cyt b 基因的研究报道不少^[9-12], 但草鱼线粒体 cyt b 基因的研究未见报道, 仅在 GenBank 查到一则草鱼线粒体 cyt b 基因的序列(AF051860)。本文报道了草鱼线粒体 cyt b 基因的克隆和序列分析结果, 并与 GenBank AF051860 序列、鲤科鱼类的 cyt b 序列以及多个目的鱼类 cyt b 基因序列进行了比较分析。

1 材料和方法

1.1 材料

实验草鱼购自广州白鹤洞市场。DNA Extraction Kit、PCR Clean Up Kit 和 pGEM-T Easy Vectors System 为 Promega 公司产品。引物由上海生工公司合成。大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。限制性内切酶、连接酶及其他主要试剂为 Promega 公司和华美生物工程公司产品。

1.2 草鱼肝脏总 DNA 的提取

活体解剖, 取肝脏组织 20 mg, 按 DNA Extraction Kit 方法提取总 DNA。

收稿日期: 2001-12-10.

基金项目: 中国水产科学研究院基金资助项目(99-08-03).

作者简介: 叶 星(1962-), 女, 副研究员, 硕士, 从事水产生物技术方面研究. E-mail: yexing@163.net

1.3 DNA 扩增与序列测定

参照鲢、鲤、金鱼等鱼类线粒体 DNA 序列^[13-14], 选择位于 *cyt b* 基因外侧保守性较高的区域设计合成草鱼线粒体 *cyt b* 基因的 PCR 扩增引物, 上游引物 P₁: 5' - CAC CGT TGT TAT TCA CAT AC - 3'; 下游引物 P₂: 5' - AGA ATC CTA GCT TTG GGA - 3'。PCR 反应总体积为 100 μ L。循环前先在 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min; 每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。共 30 个循环。最后 1 次循环结束时 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物用 PCR Clean Up Kit 纯化回收后, 与 T 载体进行连接反应, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 于含氨苄青霉素的 LB 平板上生长过夜。挑选转化子进行质粒提取和重组子筛选。电泳法和酶切法确定目的片段的插入。操作方法参照 Sambrook 分子克隆手册^[15]。

1.4 序列测定

选取重组质粒 pGEM-T-gccytb6 和 pGEM-T-gccytb10, ABI PRISMTM377 全自动荧光测序仪上测序。

2 结果

2.1 草鱼 *cyt b* 基因的扩增和克隆

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳显示有 1 条清晰明亮的带, 约 1.3 kb。此扩增产物经纯化回收后, 与 T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 。筛选重组子, 提取质粒经 *Eco*R I 酶切, 结果显示除了约 3.9 kb 的载体外, 还有 1 条约 1.3 kb 的片段, 说明所挑选的质粒有目的片段的插入(图 1)。共得到 5 个具有插入片段的重组质粒, 选取其中 2 个重组质粒测序并分别命名为 pGEM-T-gccytb 6 和 pGEM-T-gccytb10。

2.2 重组质粒的测序

pGEM-T-gccytb 6 和 pGEM-T-gccytb10 重组质粒测序的结果完全一致。克隆片段全长为 1 254 bp, 其中包括草鱼 *cyt b* 基因 1 140 个碱基(见图 2), 含 1 个起始密码子 ATG, 以及 *cyt b* 基因两端外侧片段的 114 个碱基。本文所克隆的基因序列已登录 GenBank 数据库, 序号为 AF420424。

2.3 草鱼 *cyt b* 与 GenBank 部分鱼类序列的比较

用 DNA 分析软件 VECTOR NTI 6.0 将草鱼 *cyt b* 序列翻译成氨基酸序列(图 3)。将其与 11 个目 18 种鱼的 *cyt b* 氨基酸序列比较, 结果显示具有

良好的同源性。其中与同属鲤科的软口鱼(*Chondrostoma nasus*)和(*C. polylepis*)、鲫(*Carassius auratus*)、雅罗鱼(*Leuciscus pyrenaicus*)的同源性均在 90% 以上。而与草鱼亲缘关系较远的鳗鲡目的 *Anguilla bengalensis* 和真鲨目的白斑星鲨(*Mustelus manazo*)、鼠鲨目的 *Squalus acanthias* 的同源性相对较差, 均低于 80%。同时根据比较结果构建分子系统树(图 4), 显示根据 *cyt b* 基因序列获得的分类结果与传统分类结果基本吻合(表 1)。

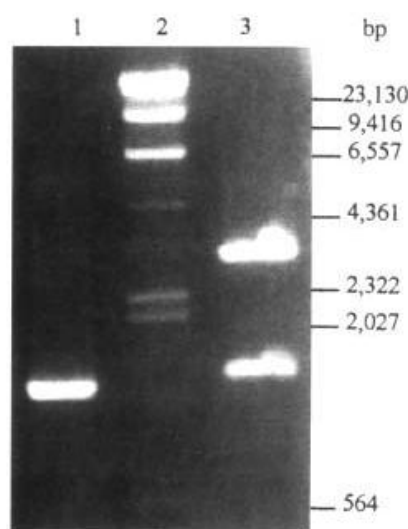


图 1 草鱼 *Cyt b* 基因的扩增产物和重组质粒 pGEM-T-gccytb 6 的检测

Fig.1 *Cyt b* PCR products and identification of pGEM-T-gccytb 6

1. *Cyt b* PCR 产物 PCR products; 2. λ DNA/*Hind* III; 3. pGEM-T-gccytb 6 质粒 *Eco*R I 酶切 pGEM-T-gccytb 6/*Eco*R I

3 讨论

本实验克隆的草鱼线粒体 *cyt b* 基因序列和推测的氨基酸序列与其他鱼类的比较均有较高的同源性。草鱼的 *cyt b* 基因共 1 140 个碱基, 含起始密码子 ATG。终止密码则是在转录成 mRNA 时在 3' 端的 T 碱基上加上 AA 而形成 TAA 终止密码子。在其他一些鱼类如鲢等(GenBank NC001960)也可见这种现象。这与剑尾鱼线粒体 *cyt b* 基因(GenBank AY056056)^[16], 以及报道的大多数鱼类 mtDNA 的 *cyt b* 基因不同^[17-18], 剑尾鱼及大多数鱼的 *cyt b* 基因的 1 140 个碱基中含有起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA。将本实验得到的序列与 Xiao

等^[4]的 AF051860 序列比较显示,2 个序列的 1 140 个碱基中只有 3 个碱基的差异,分别位于第 570、600 和 980 号碱基上,同源性为 99.7%。由于氨基酸的密码子简并性,翻译成为氨基酸后只有第 190 号氨基酸的差别,本序列的为丙氨酸,而 Xiao 等^[4]的则为甘氨酸。进一步与上文中所述的其他鱼类进行分析比较,发现 19 种鱼中第 190 号氨基酸为丙氨酸的鱼类有 15 种,约占 79%。在所比较的 19 种鱼 cyt b 的 380 个氨基酸中,有些区域的序列完全相同,其中有几个较长的区域:第 48 位到 57 位;127 位到 153 位;174 位到 184 位;263 位到 297 位,推测

这些高度保守的区域与 cyt b 的功能有着密切的关系。上述的 190 号氨基酸不在这些范围内,估计对基因的功能不会有太大的影响。对人类的 cyt b 基因的研究显示,某些碱基的突变与疾病相关,如人的第 15 257 位核苷酸位置上点突变与一种遗传性视神经病变密切相关^[19]。研究发现,压力负荷型心肌肥厚模型形成初期的大鼠心肌中 cyt b 基因表达增多,说明 cyt b 基因在心肌肥厚发生的早期对心功能代偿有一定贡献^[8]。草鱼 cyt b 基因的结构及表达与机体功能的关系,特别是疾病易感性的关系尚待深入研究。

表 1 草鱼与其他 18 种鱼类 cyt b 基因推测的氨基酸序列同源性比较

Table 1 Homology of cyt b gene deduced amino acid sequences of grass carp and other fishes

分类地位 Taxonomy	品种 Species	同源性/% Homology	分类地位 Taxonomy	品种 Species	同源性/% Homology
鲤形目	<i>Chondrostoma polylepis</i>	92.6	鲈形目	<i>Poeciliopsis monacha</i>	83.2
鲤形目	<i>Leuciscus pyrenaicus</i>	91.8	鲈形目	<i>Xiphophorus helleri</i>	82.9
鲤形目	<i>Chondrostoma nasus</i>	91.8	鲈形目	<i>Sebastes umbrosus</i>	82.9
鲤形目	<i>Carassius auratus</i>	91.3	鲈形目	<i>Plecoglossus altivelisi</i>	81.6
鲤形目	<i>Cyprinus carpio</i>	90.8	鲈形目	<i>Paralichthys olivaceus</i>	81.3
鲤形目	<i>Leuciscus carolitertii</i>	88.7	鲈形目	<i>Rhamdia laticauda</i>	81.1
鲑形目	<i>Salmo salar</i>	85.8	鲈形目	<i>Anguilla bengalensis</i>	79.6
鲟形目	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	84.5	真鲨目	<i>Mustelus manazo</i>	77.7
鲤形目	<i>Danio rerio</i>	84.2			
鲈形目	<i>Morone saxatilis</i>	83.4			

```

1 atggcaagcc tacgaaaaac ccaccacta ataaaaatcg ccaacgacgc gctagtcgat
61 cttccacac catctaatat ctctgcatga tgaaactttg gateccttct aggattatgc
121 ttaattactc aaatcctaac cggactgttc ttagecatgc attacacttc tgacaletca
181 accgcattct catcagtagt ccacatttgc cgggacgtca attacggtg acttatccgc
241 aacctacacg ccaacggggc atcattcttt ttatctgtta ttatataca cattgctcgc
301 ggctatact atggatccta cctttacaaa gaaacctgaa atattggagt agtctactc
361 ctattagtta taataacggc cttcgttggc tacgtcctcc catgaggaca aatatctttt
421 tgaggcgcta ccgtaattac aaacctacta tcagcagtec cctacatagg agatactctc
481 gtccaatgaa tttgaggtgg cttctcagta gataatgcaa cactaacacg atttttgcga
541 ttccatttcc tattaccatt catcgtcgcg gcgcgaaccc tectacacct actcttecta
601 caggaacag gatcaataa cccaatcgga ctaaaciccg acgcagataa aatttcctc
661 caccatact ttctatacaa agatcttita ggatttgtta taatattatt agctctcaca
721 tcattagcac tattttcccc aaatctacta ggagaccacg aaaacttcac ccagcgaac
781 ccactagtta cccctccaca cattaaacca gaatgatact tctattttgc ctacgccatc
841 ctacgatcta ttccaacaa actaggaggg gtccttgcac tattatttcc cactcagta
901 ctaatagtag tgccaatctt acacacctca aaacaacgag gactaacatt ccgcccacac
961 acccaattcc tatttctgaac ctagtagca gacatgatta ttctgacatg aattggaggc
1021 ataccgtag aacatccata tgcattatt ggacaaattg catcagtcct ttatttcgca
1081 ttattcctca ttttaacccc actagcaggg tgattagaaa ataaagcact aaaatgagct

```

图 2 草鱼 cyt b 基因的核苷酸序列

Fig.2 Complete nucleic acid sequences of grass carp cyt b gene

注:序列开头阴影部分为起始密码子,最后 1 个碱基 T 在转录时加上 AA 而形成终止密码子

Note: Sequences in shadow at the beginning are start codon. The last base in shadow is the first base of stop codon in which AA base will be added to form a stop codon.

MASLRKTHPLMKIANDALVDLPTPSNISAWWNFGSLGLCLITQILTGLFLAMHYTSDISTAFSS
 VVHICRDVNYGWLIRNLHANGASFFFCIYMHARGLYGSLYKETWNIGVLLLVMMTAFVG
 YVLPWQMSFWGATVITNLLSAVPYMGDTLVQWIWGGFSVDNATLTRFFAFHLLPFIVAAATLL
 HLLFLHETGSNNPGLNSDADKISFHPYFSYKDLLGFVMMLLALTSLALFSPNLLGDPENFTPAN
 PLVTPPHIKPEWYFLFAYAILRSIPNKLGGVLALLFSILVLMVVPILHLSKQKGLTFRPITQFLF
 WTLVADMILTWIGGMPVEHPYVIIGQIASVLYFALFLILTPLAGWLENKALKWA

图3 草鱼 cyt b 基因的推测氨基酸序列

Fig.3 Deduced amino acid sequences of grass carp cyt b gene

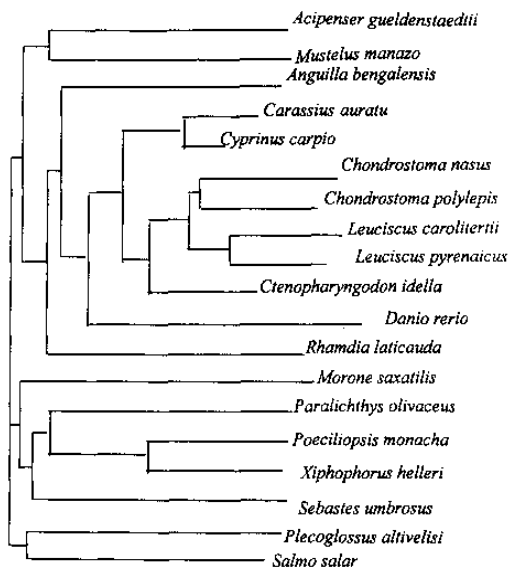


图4 根据草鱼与 GenBank 中 18 种鱼 cyt b 基因序列的比较构建的分子系统树

Fig.4 Phylogenetic tree derived from grass carp and other 18 fishes' cyt b nucleotide sequences

参考文献:

- [1] 中国水产科学研究院. 21 世纪我国渔业科技重点领域发展战略研究[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1999. 112 - 127.
- [2] 李静涵. 线粒体[M]. 北京: 北京大学出版社, 1988. 58 - 62.
- [3] Schoepp B, Breton J, Parot P, et al. Relative orientation of the hemes of the cytochrome bc(1) complexes from *Rhodobacter Sphaeroides*, *Rhodospirillum rubrum*, and beef heart mitochondria, A linear dichroism study[J]. J Biol Chem, 2000, 275(8): 5 284 - 5 290.
- [4] Xiao Wuhan, Zhang Yaping, Liu Huanzhang, et al. Molecular Systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): Taxonomy, Biogeography, and Coevolution of a special Group Restricted in East Asia[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 18(2): 163 - 173.
- [5] Meyer A, Kocher T D, Basasibwaki P. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences[J]. Nature, 1990, 347: 550 - 553.
- [6] Song C B, Near T J, Page L M. Phylogenetic relations among percoid fishes as inferred from mitochondrial cytochrome b DNA sequence data[J]. Mol Phylogenet Evol, 1998, 10(3): 343 - 353.
- [7] Bernardi G, Powers D A. Molecular phylogeny of the prickly shark, *Echinorhinus cookei*, based on a nuclear (18srRNA) and a mitochondrial (cytochrome b) gene[J]. Mol Phylogenet Evol, 1992, 1(2): 281 - 283.
- [8] 李健, 田 隼, 陈兰英. 压力负荷型心肌肥厚相关的细胞色素 b 基因的筛选及克隆[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17(6): 720 - 724.
- [9] Arnason E, Petersen P H, Paisson S. Mitochondrial cytochrome b DNA sequence variation of Atlantic cod, *Gadus morhua*, from the Baltic and the white Seas[J]. Hereditas, 1998, 129: 37 - 43.
- [10] Farias IP, Orti G, Sampaio J, et al. The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes[J]. J Mol Evol, 2001, 53(2): 89 - 103.
- [11] Martin A P, Palumbi S R. Protein evolution in different cellular environments: cytochrome b in sharks and mammals[J]. Mol Bio Evol, 1993, 10(4): 873 - 891.
- [12] Kiril C S V, Slobodeniuk S I, Belikov S I. Phylogenetic relationships between 16 species of Lake Baikal sculpin fish based on a nucleotide sequence analysis of a mitochondrial DNA fragment of the cytochrome b gene[J]. Mol Bio, 1995, 29(4): 817 - 825.
- [13] Briolay J, Galtier N, Brito R M, et al. Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome b DNA sequences[J]. Mol Phylogenet Evol, 1998, 9(1): 100 - 108.
- [14] Hansen M M, Ruzzante D E, Nielsen E E, et al. Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.)[J]. Molecular Ecology, 2000, 9: 583 - 594.
- [15] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.) [M]. New York: Cold Spring Harbor

- Laboratory Press, 1989.
- [16] 叶 星, 白俊杰, 劳海华, 等. 剑尾鱼线粒体细胞色素b基因的序列分析[J]. 中国实验动物学报, 2002, 103: 180-185.
- [17] Chang Y C, Huang F L, Lo T B. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome[J]. J Mol Evol, 1994, 38: 138 - 155.
- [18] Christiane Delarbre, Nathalie Spruyt, Celine Delmarre, et al. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the dogfish, *Scyliorhinus canicula* [J]. Genetics, 1998, 150: 331 - 334.
- [19] Johns D R, Smith K H, Savino P J, et al. Leber's hereditary optic neuropathy. Clinical manifestations of the 15257 mutation [J]. Ophthalmology, 1993, 7: 981 - 986.

Clone and characterization of mitochondrial cytochrome b gene from grass carp *Ctenopharyngodon idella*

YE Xing, BAI Jun-jie, LAO Hai-hua, JIAN Qing, LUO Jian-ren

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510380, China)

Abstract: The total DNA was extracted from the liver tissue of grass carp with DNA Extraction Kit and prepared as templates. The grass carp mitochondrial cytochrome b (cyt b) gene was amplified by PCR with a pair of specific primers. After analyzed by agarose gel electrophoresis, the amplified products were purified and cloned into T vectors of pGEM-T easy vector system and the transformants were selected and confirmed by restriction enzyme analysis. To clone and analyze the whole sequence of mitochondrial cyt b gene of grass carp two recombinants were chosen to test the sequence of the inserted gene. A sequence with total length of 1 254 bp including 1 140 nucleotides of cyt b gene and partial sequences at both sides was cloned and the cyt b gene of grass carp is proved to have good homology with other 18 species of fishes recorded in the GenBank that it has over 90% homology with *Chondrostoma nasus*, *C. polylepis*, *Carassius auratus* and *Leuciscus pyrenaicus* but under 80% homology with *Anguilla bengalensis* and *Mustelus manazo*. The phylogenetic tree built from the homology of grass carp cyt b gene and the 18 fishes is consistent with the traditional taxonomic results.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; mitochondria; cytochrome b; nucleic acid sequence

消息发布:

《农业图书信息网》最近在北京开通, 该网集中了农业图书信息: 农业、林业、生物、食品、农业教材、环保、化工等各类图书及音像制品。

欢迎大家光临本网站, 查询图书、下载目录。

网址: www.agribook.net

门市部地址: 北京中关村南大街12号, 中国农科院幼儿园北门

邮购地址: 北京中关村南大街12号, 中国农科院266信箱

电话: 010-62116838