

5种鲤形目鱼的 β 珠蛋白基因cDNA的克隆

常重杰, 陈颖, 杜启艳

(河南师范大学生命科学院, 河南新乡 453002)

摘要:根据 β 珠蛋白的N末端和C末端氨基酸序列的保守性设计20 bp长的简并引物,用RT-PCR方法扩增并克隆了鲤(*Cyprinus carpio*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲫(*Carassius auratus* Linnaeus)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)、大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*) 5种鲤形目鱼的 β 珠蛋白基因cDNA。结果表明,克隆的5种鲤形目鱼的 β 珠蛋白基因cDNA全长为441 bp。但它们所编码的氨基酸序列却有较大的差异,鲤和泥鳅的序列相似性最高,达97.93%,而泥鳅和大鳞副泥鳅的相似性最小,仅有80.68%,其余的相似性介于二者之间。

关键词:鲤;鲫;泥鳅;大鳞副泥鳅;草鱼; β 珠蛋白基因

中图分类号: Q959.468;Q785

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2003)02-0102-04

日前在转基因鱼研究中所用的目的基因主要有2种:生长激素基因(GH)^[1]和抗冻蛋白基因(AFP)^[2]。许多学者对鱼类抗冻蛋白的分子结构、抗冻机理及其基因的克隆等方面进行了详细的研究,为转AFP基因鱼的研究奠定了基础。水中的溶氧量是鱼类生长的主要限制因子之一,而鱼类对低溶氧量的耐受性主要是由血红蛋白与氧的亲性和的高低决定的。从高耐受性鱼类中克隆珠蛋白基因导入低耐受性鱼类中,将有可能提高受体鱼对低溶氧的耐受性。目前仅有日本的Yoshizaki^[3]将鲫的珠蛋白转入虹鳟中的报道,而国内尚未见有同类的研究。出于此目的,我们克隆了鲤(*Cyprinus carpio*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲫(*Carassius auratus* Linnaeus)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)、大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)的 β -珠蛋白基因的cDNA,并对其氨基酸序列进行了比较。

1 材料与方法

1.1 材料

鲤、草鱼、泥鳅、大鳞副泥鳅、鲫购于新乡市集贸市场。

收稿日期:2002-05-30。

基金项目:河南省高校杰出科研人才创新工程资助项目(2001KYCX010)。

作者简介:常重杰(1965-),男,博士,教授,从事动物遗传学研究。

E-mail:zhjeh@public.xxptt.ha.cn

市场。

1.2 方法

1.2.1 总RNA的制备 采用Promega公司总RNA提取试剂盒。断尾取血0.2~0.3 mL,1×PBS洗2次,加入变性液600 μ L,研磨直至肉眼看不见块状物质,立即加入NaAc(pH 4.0)60 μ L混匀,加入饱和酚600 μ L。上下颠倒离心管充分混匀10 s,冰浴15 min,12 000 r/min 4℃离心20 min。转移上层水相至新的离心管中,加入等体积异丙醇-20℃放置30 min。12 000 r/min 4℃离心10 min。弃上清,1 mL 75%乙醇洗涤沉淀,室温放置15 min后,12 000 r/min 4℃离心10 min。干燥沉淀,最后溶于30 μ L水中。

1.2.2 RT-PCR 采用Promega公司的Access RT-PCR System试剂盒。50 μ L反转录反应体系包括1 μ L总RNA,上游引物和下游引物浓度各为50 pmol/L,10 mmol/L dNTP混合物1 μ L,AMV/Tfl 5×缓冲液10 μ L,25 mmol/L MgSO₄ 5 μ L,AMV反转录酶5 U,Tfl DNA聚合酶5 U。48℃45 min进行反转录。PCR循环参数为:94℃2 min,94℃30 s,60℃1 min,68℃2 min,40个循环,循环结束后68℃延伸7 min。

上游引物:5'-GT(GTAC)GA(ATGC)TGGAC(ATGC)GA(CT)(CG)(AC)(ATGC)GA-3'

下游引物:5'-TG((AG)TA(CT)T(CG)(CT)CT

(ATGC)CA(ATGC)A(AG)(ATGC)GC 3'

1.2.3 PCR产物的克隆及测序分析 PCR产物用上海生工DNA凝胶回收试剂盒回收纯化。在T4 DNA连接酶的作用下与T-载体连接4℃过夜,转化前在室温放置1 h。将10 μL连接产物加入200 μL JM109感受态菌中,冰浴30 min,42℃水浴90 s,加入800 μL SOC培养基,37℃180 r/min培养45 min,取100 μL转化菌液涂布于含有IPTG、X-Gal、Amp(100 mg/mL)的LB固体培养基上,37℃培养过夜。蓝白斑筛选重组子,PCR检测阳性克隆。委托上海生工公司利用双脱氧法测定DNA序列。

1.2.4 β珠蛋白的序列分析 利用Blast软件包对克隆出的5种鱼的β珠蛋白cDNA序列在GenBank中进行序列相似性比较。

2 结果

2.1 RT-PCR扩增

利用简并引物(按图1下划线的氨基酸设计合成)RT-PCR扩增5个物种的总RNA,在鲤、草鱼、鲫、泥鳅、大鳞副泥鳅中均得到1条450 bp的扩增带。其与引物所设计的扩增大小一致(图2)。在泥鳅中有1条大于3 000 bp的扩增带为非特异扩增。

泥鳅 <i>M. anguillicaudatus</i>	VEWTDPERSA I IGLWGKLN DELGPQALAR CLIVYPWTQR YFASFGNLSS 1-50
大鳞副泥鳅 <i>P. dabryanus</i>	VEWTDARHS ITGVWGKISV DEIGPQALAR CLIVYPWTQR YFAAFGNLSS
鲫 <i>C. auratus</i>	VEWTDARSA I IGLWGKLN DELGPQALAR CLIVYPWTQR YSATFGNLSS
草鱼 <i>C. idellus</i>	VEWTDDETA I IGLWGKLN DELGPQALS CLIVYPWTQR YFATFGNLSS
鲤 <i>C. carpio</i>	VEWTDDEDSA I IGLWGKLN DELGPQALAR CLIVYPWTQR YFASFGNLSS
泥鳅 <i>M. anguillicaudatus</i>	PAAIMDNPKV AAHGRTVMGG LERAIKNMDN TKATYAPLSV MHSEKLRVDP 51-100
大鳞副泥鳅 <i>P. dabryanus</i>	AAATMGPNKV SAHGKVMGG LERAIKNLDN TKDTYAALSI MHSEKLRVDP
鲫 <i>C. auratus</i>	PAAIMGNPKV AAHGRTVMGG LERAIKNMDN TKATYAPLSV MHSEKLRVDP
草鱼 <i>C. idellus</i>	PAAIDNPKV AAHGRTVMGG LERAIKNMDN TKATYSALSV MHSEKLRVDP
鲤 <i>C. carpio</i>	PAAIMDNPKV AAHGRTVMGG LERAIKNMDN TKATYAPLSV MHSEKLRVDP
泥鳅 <i>M. anguillicaudatus</i>	DNFRLLADYI TWCAAMKFGP SGFSANVQEA WQKFLSVVVS <u>ALCRQYH</u> 101-147
大鳞副泥鳅 <i>P. dabryanus</i>	DNFRLLGDCI TWCVAMKLG P SVFTPDVHEA WQKFLSVVVS <u>ALCRQYH</u>
鲫 <i>C. auratus</i>	DNFRLLADCI TWCAAMKFGP SGFNADVQEA WQKFLSVVVS <u>ALCRQYH</u>
草鱼 <i>C. idellus</i>	DNFRLLADCI TWCAAMKFGP SGFNADVQEA WQKFLSVVVS <u>ALCRQYH</u>
鲤 <i>C. carpio</i>	DNFRLLADCI TWCAAMKFGP SGFSANVQEA WQKFLSVVVS <u>ALCRQYH</u>

图1 5种鱼的β珠蛋白氨基酸序列

Fig. 1 β-globin amino acid sequences of five fishes

2.2 阳性克隆的测序

测序结果表明:在鲤、草鱼、鲫、大鳞副泥鳅、泥鳅中β珠蛋白cDNA均为441个核苷酸(GenBank注册号为AF528158, AF528160, AF528159, AF528161, AF528200)。5种鱼的cDNA分别编码的氨基酸序列见图1。从表1可以看出,鲤和泥鳅的序列相似性最高,达到97.93%;而泥鳅和大鳞副泥鳅的相似性最小,仅有80.68%,其余的相似性介于二者之间。

2.3 不同鱼类β珠蛋白的聚类分析

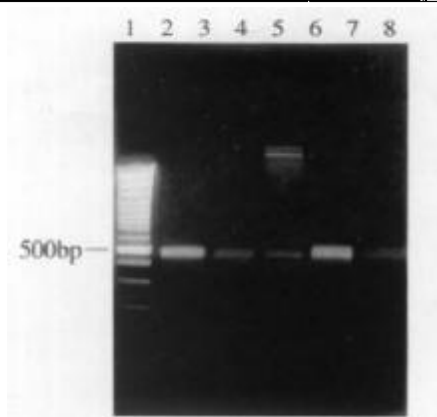
把克隆的5种鲤形目鱼的β珠蛋白氨基酸序列与Genebank中查寻的其他6种鱼的β珠蛋白氨基酸序列进行相似性分析。用Spss11.0软件包中的Within-groups linkage方法计算出11个物种的聚类分支图(图3)。

3 讨论

不同种类的鱼对于水体中溶氧量有不同的耐受力,这种耐低氧能力主要是由红细胞内的血红蛋白决定的,而血红蛋白的合成是由珠蛋白基因编码并调控的。不同种类的鱼的珠蛋白氨基酸组成有很大的差异,因此,与氧结合的亲和力也有所不同。本研究所用5个物种均属鲤形目,具有较近的亲缘关系。但是由于生活环境差异较大,而使它们对水中的溶氧量有不同的敏感度,并且窒息点也有较大的差异^[4-5]。从这5个物种克隆的β珠蛋白氨基酸序列组成上看,它们也具有较大的差异。鲤中的S42,大鳞副泥鳅中的S10、T12、S61、G107、A44、V66、V83、H128,草鱼中的D6、S186位点都出现了极性替换。由此,可推测这些位点的改变有可能增加或减少了

表1 5种鲤科鱼类的 β 珠蛋白氨基酸序列相似性Table 1 Similarity of β -globin amino acid sequences of five fishes

	泥鳅 <i>M. anguillicaudatus</i>	大鳞副泥鳅 <i>P. dabryanus</i>	鲫 <i>C. auratus</i>	草鱼 <i>C. idellus</i>	鲤 <i>C. carpio</i>	%
泥鳅 <i>M. anguillicaudatus</i>	100					
大鳞副泥鳅 <i>P. dabryanus</i>	80.69	100				
鲫 <i>C. auratus</i>	93.79	82.88	100			
草鱼 <i>C. idellus</i>	88.97	84.25	91.78	100		
鲤 <i>C. carpio</i>	97.93	80.82	93.84	89.04	100	



1. 100 bp ladder 标准物; 2. 草鱼; 3. 鲫; 4. 泥鳅; 5. 大鳞副泥鳅; 6. 鲤
1. 100 bp ladder marker 2. *C. idellus* 3. *C. auratus* Linnaeus
4. *M. anguillicaudatus* 5. *P. dabryanus* 6. *C. carpio*

图2 5种鱼总RNA的RT-PCR扩增结果

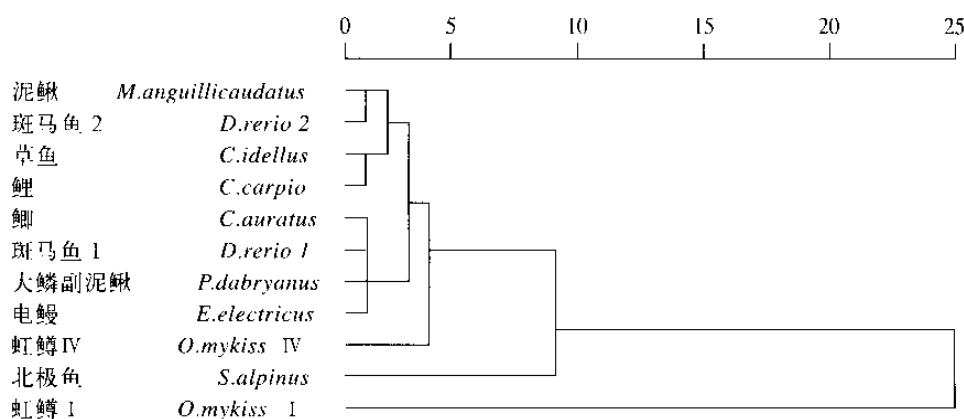
Fig. 2 The RT-PCR amplification result of total RNA in five fishes

β 珠蛋白对氧的亲合力。泥鳅和大鳞副泥鳅的亲缘关系最近,但它们的 β 珠蛋白氨基酸组成的相似性最低,为80.69%,而泥鳅与鲤的相似性最高,为97.93%。这种现象是因为鱼类成体中的血红蛋白多样性通常与它们所处的不稳定的环境、不同的栖息地及所承受的较大的进化压力等因素有关。

由于近年鱼类和其他水生动物养殖技术的发展,养殖业急需高品质和抗逆性强的品种。因此,培养耐低氧的转珠蛋白基因鱼在水产养殖业具有很大的经济效益及广阔的前景。

参考文献:

- [1] 魏彦章,谢岳峰,许克圣,等. 人生长激素基因在转基因鲤鱼体内的遗传[J]. 生物工程学报, 1992, 8(2): 140-144.
- [2] Hew C L, Davies P L, Fletcher G. Antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon[J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1992, 1(4/5): 309-317.

图3 根据 β 珠蛋白氨基酸序列相似性构建的11个物种的聚类图Fig. 3 Dendrogram of 11 fishes based on β globin amino acid sequences similarity

- [3] Yoshizaki G. Introduction of carp α -globin gene into rainbow trout [J]. Jap Soc Sci Fish, 1991, 57(5): 819-824.
- [4] 施琅芳. 鱼类生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1991. 86.
- [5] 赵振山, 印杰, 高贵琴, 等. 泥鳅与大鳞副泥鳅耗氧率与窒息点的研究[J]. 水利渔业, 1999, 19(1): 2-3.

Cloning of cDNA of β Globin in five species of *Cypriniformes*

CHANG Zhong-jie, CHEN Ying, DU Qi-yan

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China)

Abstract: The complete cDNA sequence of β Globin genes were isolated from *Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idellus*, *Carassius auratus* Linnaeus, *Misgurnus anguillicaudatus* and *Paramisgurnus dabryanus*, respectively, by RT-PCR. To obtain a complete amino acid sequence, a pair of 20-meric degenerate consensus primers were designed based on N-terminal and C-terminal conservative amino acid sequences of β chain of globin. Using these primers, the β chain of globin (450 bp) was amplified from the five fishes. Compared with the amino acid sequences of the five fishes, the conclusion is that although the five fishes all belong to *Cypriniformes*, there are great differences in their amino acid sequences.

Key words: *Cyprinus carpio*; *Ctenopharyngodon idellus*; *Carassius auratus* Linnaeus; *Misgurnus anguillicaudatus*; *Paramisgurnus dabryanus*; β globin gene

欢迎订阅《中国水产科学》

《中国水产科学》是中国水产科学研究院主办的国家级学术期刊。目前已被美国《化学文摘》(CA)、《海洋文摘》(OA)、《水科学与渔业文摘》(ASFA)和《剑桥科学文摘》(CSA), 英国《动物学记录》(ZR), 俄罗斯《文摘杂志》(PЖ)等收录。在国内被《中国学术期刊综合评价数据库》、《中国期刊网》和《中国学术期刊》(光盘版)以及《ChinaInfo》数字化期刊群全文收录; 被《中国水产文摘》、《中国水产文献数据库》、《中国学术期刊文摘》摘要收录。本刊还是“国家科技论文统计系统”及“中国科学引文数据库”的统计源期刊; 同时是中文核心期刊中“水产、渔业”类核心期刊; 本刊于1998年获全国水产优秀报刊评选一等奖, 2000年获首届《中国学术期刊》(光盘版)检索与评价数据规范执行优秀奖, 2002年获全国农业科技期刊评比一等奖。

本刊主要报道水产养殖与增殖、水产生物病害及其防治、水产生物营养及饲料、水产资源、海淡水捕捞、水产品保鲜与加工综合利用、渔业生态保护及渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器及水产基础科学等方面的最新进展、最新成果、最新技术和方法。

本刊为双月刊, A4开本, 每期88页, 双月出版, 国内外公开发行。国内定价14元/期, 全年84元(含邮费)。邮发代号: 18-250, 国内统一刊号: CN11-3446/S, 国际标准刊号: ISSN1005-8737, 国外代号4639Q。全国各地邮电局(所)办理订阅手续(可破季订阅)。漏订或补订当年和过期期刊, 请直接向编辑部订阅。另有少量合订本, 欢迎购买。

编辑部地址: 北京市丰台区青塔村150号, 邮政编码: 100039, 联系电话: 010-68673921, 传真: 010-68673931; E-mail: jfishok@publica.hj.cninfo.net