

西伯利亚鲟 β -actin 基因 cDNA 全长克隆、序列分析及其作为内参基因的应用研究

施志仪, 程千千, 宋佳坤

(上海海洋大学 水产与生命科学学院, 上海 201306)

摘要: 采用同源克隆和 RACE 技术获得西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*) β -actin 基因 cDNA 全长, 序列分析表明西伯利亚鲟 β -actin 基因 cDNA 全长 1 322 bp, 其包括的 137 bp 的 5'端非翻译区, 57 bp 的 3'端非翻译区和编码 375 个氨基酸残基的 1 128 bp 开放阅读框。与其他物种比对, 该基因具极高的保守性。同时也利用同源克隆技术获得了西伯利亚鲟 Sox2 基因的同源保守区, 该序列长 768 bp, 编码 256 个氨基酸, 也具较高的保守性, 与其他物种的相似性在 70%以上。以 β -actin 作为内参基因, 对 Sox2 基因在西伯利亚鲟成鱼各组织及胚胎发育各时期进行实时荧光定量 PCR 检测, 发现 Sox2 基因在不同组织中均有表达。其中, 在肝、胰、肾、脑 4 个组织中表达量差距不大, 均处于相对较低的水平, 在肌肉组织中表达量最高, 达到了肝脏的 10.4 倍。同时 Sox2 基因虽在西伯利亚鲟胚胎发育各时期均有表达, 但表达也具明显的时间差异性。在受精卵期、囊胚期 Sox2 基因的相对表达量较低, 在原肠期、神经胚期、视泡形成期和心脏形成期 Sox2 基因相对表达量较高, 且在心脏形成期达到最高点。本研究为量化西伯利亚鲟发育分化过程中相关基因提供了坚实的参照工具, 增加了后续试验的可信度, 同时可为今后深入研究西伯利亚鲟 Sox2 在侧线神经节分化发育、细胞迁移过程中的作用提供基础参考依据。[中国水产科学, 2010, 17(6): 1173–1182]

关键词: 西伯利亚鲟; β -actin; cDNA 全长克隆; Sox2; 内参基因

中图分类号: Q786; S 917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)06-1173-10

西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)隶属鲟形目(Acipenseriformes)、鲟科(Acipenseridae)、鲟属(*Acipense*),为软骨硬鳞鱼,分布于西伯利亚河流和湖泊。鲟形目鱼类是一类原始古老的软骨硬鳞鱼类,在鱼类乃至整个脊椎动物进化史上占有重要的地位^[1]。西伯利亚鲟作为鲟形目鱼类中重要的一种,是地球上最为古老的物种和鱼类之一,因而具极高的进化研究价值。随着分子生物学的兴起,人们对西伯利亚鲟的研究也将向纵深的方向发展,且近来集中于西伯利亚鲟分子进化、胚胎和神经发育相关功能基因的研究。

肌动蛋白(Actin)最早从兔的骨骼肌中发现并命名,是一类高度保守的蛋白质。它是由多个基

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^[2]。参与胞质分裂、形态的维持、生长等多种重要生理活动,其含量在某些细胞中甚至占蛋白总量的 10%。作为肌动蛋白中最重要的成员之一, β -actin 除有基因序列高度保守的特征外,还具有 mRNA 表达数量高,数量稳定,几乎不随年龄产生变化的特点,因此被称之为管家基因(House-keeping genes)。在测定某种基因的表达量时,常采用 β -actin 作为参照基因^[3],同时在核酸酶保护分析中也可作为外标^[4],其被广泛应用于分子进化、功能基因表达调控等方面的研究。随着功能基因组学的发展,基因定量技术的应用越来越广泛,传统的 RT-PCR 及实时荧

收稿日期: 2009-12-29; 修订日期: 2010-02-01.

基金项目: 上海市科委基础重大项目(073205109); 上海市重点学科水生生物学建设项目(S30701).

作者简介: 施志仪(1954-),男,教授,博士生导师,主要从事鱼类发育分子生物学方面的研究. E-mail: zyshi@shou.edu.cn

光定量 PCR(Real-time quantitative PCR)等技术多选用管家基因作为内标来评价目标基因的相对表达量。常用的内标基因包括 GAPDH (甘油醛 3-磷酸脱氢酶)、18S rRNA、28S rRNA 和 β -actin 等, 其中尤其因 β -actin 在物种内持续恒量地表达而被研究者广泛采用^[5]。

SOX(SRY-related HMG-box)是一类 SRY(Sex determination region of Y chromosome)相关基因构成的控制发育的基因家族, 编码一系列 SOX 家族的转录因子, 参与胚胎发育和细胞命运决定的调控。*Sox2* 作为该基因家族当中的一员, 在早期神经板和神经管中广泛表达^[6-7]。近年来, 有研究表明 *Sox2* 基因在斑马鱼侧线神经节前体细胞当中有剧烈的表达, 同时 *Sox2* 也被认为是鱼类侧线神经节发育的标记性基因^[8]。

本研究采用 RT-PCR 及 RACE 法, 分离、克隆了西伯利亚鲟 β -actin 基因全长, 并对其进行序列分析。在对目的基因进行定量分析研究之前, 克隆内参基因 β -actin 基因全长, 对提升试验的可靠性和可信度具有重要意义。同时, 本研究克隆了西伯利亚鲟 *Sox2* 基因的同源区序列片段, 借助 β -actin 为内参基因, 利用实时荧光定量 PCR 技术, 对该基因在西伯利亚鲟各组织及胚胎发育各时期的表达量进行研究, 从而为进一步探究该基因在西伯利亚鲟侧线神经节发育分化中的作用提供基础参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 西伯利亚鲟幼鱼和胚胎均采自浙江千岛湖鲟龙科技有限公司养殖场, 成鱼 100 尾, 胚胎 500 尾, 暂养于实验室循环水系统当中。

1.1.2 试剂 总 RNA 抽提试剂 RNAiso Reagent、反转录试剂 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) cDNA 全长获取试剂盒、3'-Full RACE Core Set Ver.2.0、5'-Full RACE Kit 实时荧光定量试剂、SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) 均购自宝生物工程(大连)有限公司。T 载体系统,

大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , Marker 购自天根生物有限公司。其他化学试剂均购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 RNA 的提取 西伯利亚鲟成鱼活体解剖, 取肝、脑、肾、肌肉、鳃各组织适量于研磨器(RNAase free)中, 同时取西伯利亚鲟胚胎受精卵期、囊胚期、原肠期、神经胚期、视泡形成期、心脏形成期小胚胎若干粒于研磨器(RNAase free)中。加入 1 mL RNAiso reagent 试剂, 匀浆后, 将上清液加入 1.5 mL 离心管中, 氯仿抽提, 异丙醇沉淀, 75 %酒精清洗, 适量 0.1% DEPC 处理过的水溶解总 RNA。后通过琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭(EB)染色显示 28S 和 18S, 检测 RNA 的完整性。

1.2.2 引物设计与合成 根据 GenBank 中已报道的鱼类 β -actin 基因序列, 运用 Primer Premier 5.0 软件结合 DNASTAR 分析软件及 BLAST 程序, 设计了 1 对扩增保守区的引物, 经测序后在该序列内部设计 1 对巢式引物进行后续 RACE 试验, 同时依据上述方法根据 GenBank 中已报道的鱼类 *Sox2* 序列, 设计 1 对扩增保守区的引物, 并根据后续测序结果, 在内部设计 1 对用来做实时荧光定量 PCR 的特异性引物, 所有引物均由上海捷瑞生物工程技术服务有限公司合成(表 1)。

1.2.3 β -actin 基因 RT-PCR、5'RACE、3'RACE 及 *Sox2* 基因 RT-PCR β -actin 基因 RT-PCR 以特异性引物 P1 与 P2, PCR 反应程序为: 94 3 min, 以下运行 30 个循环: 94 30 s, 54 30 s, 72 30 s。后续 72 延伸 10 min。5'RACE 试验以 5'-Full RACE Kit 内通用引物 P5、P6 和 β -actin 特异性引物 P2、P4 进行巢式 RT-PCR, 反应条件如下: OuterPCR, 94 3 min, 以下运行 20 个循环: 94 30 s, 54 30 s, 72 2 min。后续 72 延伸 10 min。InnerPCR, 94 3 min, 以下运行 25 个循环: 94 30 s, 55 30 s, 72 2 min。后续 72 延伸 10 min。3'RACE 实验以 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 内通用引物 P7、P8 和 β -actin 基因特异性引物 P1 和 P3 进行巢式 RT-PCR, 反应条件如下: OuterPCR, 94 3 min, 以下运行 20 个循环: 94

表1 实验中所用引物
Tab. 1 Primers used in the experiment

引物名称 Primer	引物代码 Code of primer	引物序列 Sequence of primer
<i>Actin</i> F:	P1	5'-ATGGTTGGTATGGGACAGAAAGA-3'
<i>Actin</i> R:	P2	5'-ATGGCTGGGGTGTTGAAGG-3'
<i>Actin</i> innerF:	P3	5'-ATCCTGACCTGAAGTACCCAC-3'
<i>Actin</i> innerR:	P4	5'-GGCAACACGCAGCTCATT-3'
5'RACE Outer Primer:	P5	5'-CATGGCTACATGCTGACAGCCTA-3'
5'RACE Inner Primer:	P6	5'- CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG-3'
3'RACE Outer Primer:	P7	5'-TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT-3'
3'RACE Inner Primer:	P8	5'-CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG-3'
<i>Sox2</i> F:	P9	5'-CGGGCAACTCTAACTCGAAT-3'
<i>Sox2</i> R:	P10	5'-ACAGGTGCGCTCTGGTAAG-3'
<i>Sox2</i> innerF:	P11	5'-CAAATACAGACCGAGGCG-3'
<i>Sox2</i> innerR:	P12	5'-TCCATCCTTTGATTGACCC-3'

30 s, 55 30 s, 72 2 min。后续 72 延伸 10 min。
InnerPCR, 94 3 min, 以下运行 25 个循环: 94
30 s, 55 30 s, 72 2 min。后续 72 延伸 10
min。 *Sox2* 基因 RT-PCR 以特异性引物 P9 与 P10,
PCR 反应程序为: 94 3 min, 以下运行 30 个循环:
94 30 s, 54 30 s, 72 30 s。后续 72 延伸 10
min。

1.2.4 PCR 产物克隆及测序 将 RACE 产物经
2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 用普通琼脂糖凝胶
DNA 回收试剂盒对目的基因片段进行回收纯化,
并将纯化后的 RACE 产物与 PGM-T 载体连接构
建重组质粒, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α, 经琼
脂糖 LB 平板(含 Amp⁺、IPTG 和 X-gal)培养后, 筛
选重组子进行插入片段检测。序列测定由上海桑
尼生物工程技术服务有限公司完成。

1.2.5 生物信息学及系统进化分析 应用 NCBI
(<http://www.ncbi.nlm.gov>)中的 ORFfinder 程序进
行开放阅读框(ORF)分析并将其推导为相应的氨
基酸序列, 分析 CDS 起始区域及氨基酸数量。通
过 BLAST 工具进行核酸序列相似性检索, 应用
DNAMAN6.0 构建系统进化树。

1.2.6 cDNA 第一链合成 以西伯利亚鲟各组织
及胚胎发育各时期的 RNA 为模板, 利用
PrimeScriptTM RT 试剂盒(TaKaRa, Japan)进行
cDNA 第一链合成。10 μL 反应体系: 2 μL 5 ×

PrimeScriptTM 缓冲液; 0.5 μL PrimeScriptTM RT 酶
混合液; 0.5 μL OligoDT 引物(50 μmol/L); 0.5 μL 随
机引物(100 μmol/L)总 RNA 150 ng; 加无菌 ddH₂O
至 10 μL。反转录反应条件: 37 15 min, 85 5 s。
反转录产物-20 保存。

1.2.7 Sox2 实时荧光定量 PCR 以西伯利亚鲟
各组织和胚胎发育各时期的 RNA 转录得到的
cDNA 为模板, 以西伯利亚鲟 *β-actin* 作为内参基
因进行实时荧光定量 PCR 实验。利用 SYBR[®]
Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time)试剂, 以 P11
和 P12 作为扩增 *Sox2* 特异性片段的引物, 利用 P1
和 P2 作为扩增 *β-actin* 的引物。扩增时均为 15 μL
反应体系: SYBR[®] Premix Ex TaqTM 7.5 μL, 引物
各 0.3 μL, cDNA 模板 1.5 μL, 无菌 ddH₂O 5.4 μL。
使用 Bio-RadiQ5TM 实时荧光定量监测系统进
行实验, 基于三步法设置, 运行程序如下: 第一步 95
10 min, 第二步进入 PCR 循环反应, 反应条件为:
95 10 s, 55 30 s, 72 30 s, 运行 40 个循环,
且每一次在 72 的时开始采集荧光信号。第三步
绘制溶解曲线, 从 55 上升到 90 每次温度变化
0.5 , 运行 10 s 并且采集荧光信号, 检测反应特
异性。整个 PCR 过程中荧光量变化由电脑监视器
实时监控并记录。实验中每个样本均做 3 个重复,
每个重复 5 尾鱼。后续实验数据利用 iQ5 Optical
System Software (Version 2.0)进行初步处理后,

运用 $2^{\Delta\Delta Ct}$ 法进行实验数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取

将提取的西伯利亚鲟成鱼, 各组织及胚胎发育各时期 RNA 进行电泳检测, 电泳显示 28S、18S rRNA 条带清晰(图 1 和图 2), 浓度比约为 2:1, 说明提取的 RNA 完整性良好, 符合后续 RT-PCR 及 RACE 扩增的要求。

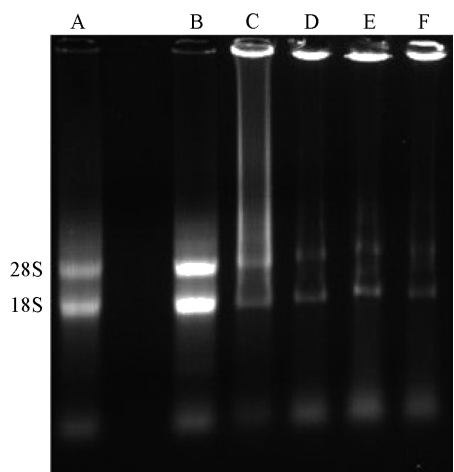


图 1 成鱼全鱼及各组织 RNA 电泳结果

A: 成鱼全鱼; B: 肝; C: 脑; D: 肾; E: 肌肉; F: 胰.

Fig. 1 RNA from whole fish and different tissues of adult fish

A: whole fish; B: liver; C: brain; D: kidney; E: muscle; F: pancreas.

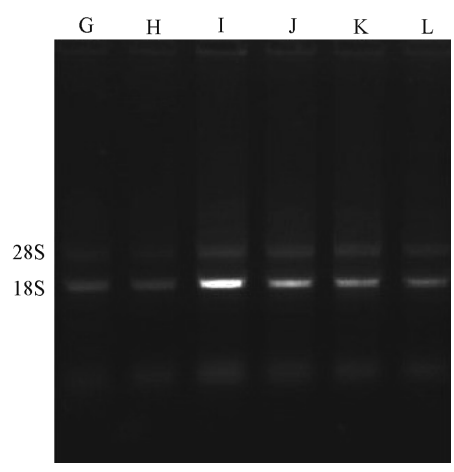


图 2 胚胎发育各时期 RNA 电泳结果

G: 受精卵期; H: 囊胚期; I: 原肠期; J: 神经胚期; K: 视泡形成期; L: 心脏形成期.

Fig. 2 RNA from each embryonic development stages
G: fertilized egg; H: blastula stage; I: gastrula stage; J: neurula stage; K: formation of visual bubble; L: formation of heart.

2.2 β -actin 同源区 RT-PCR 扩增结果

用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增, 1%琼脂糖凝胶电泳结果显示, 在 Marker 250~100 bp 间有 1 条明显的目的带(图 3), 与预期片段长度大小相符。测序得到 1 个长度为 244 bp 的序列, 同时对测序结果进行 BLAST 比对, 发现该序列与施氏鲟 (*Acipenser schrenckii*)、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、罗非鱼(*Tilapia mossambica*) 的同源性分别为 93%、91%、91%、91%, 故可初步推测是西伯利亚鲟 β -actin cDNA 的部分序列。

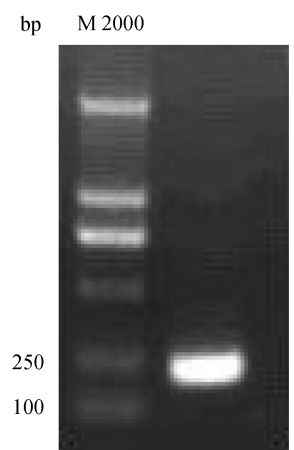


图 3 β -actin 同源区 RT-PCR 电泳结果

Fig. 3 RT-PCR result of β -actin homology region

2.3 5'RACE 及 3'RACE 结果

以通用引物 P5、P6 和 β -actin 特异性引物 P2、P4 进行巢式 RT-PCR 完成 5'端扩增, 电泳, 在 500~250 bp 间有 1 条明显的目的带(图 4), 与预期大小相符, 测序后得到一个长度为 392 bp 的序

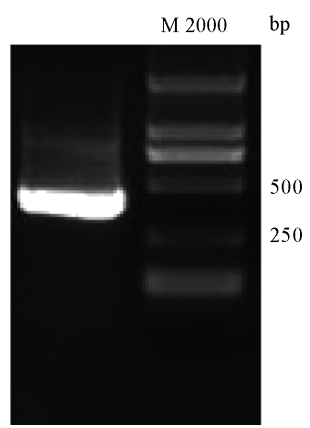


图 4 β -actin 5'RACE 电泳结果

Fig. 4 3'RACE of β -actin gene

列。同时利用试剂盒内通用引物 P7、P8 和 β -actin 基因特异性引物 P9 和 P11 进行巢式 RT-PCR, 进一步完成 3'端扩增, 电泳图上可看到在 1 000 bp 左右有 1 条明显的条带(图 5), 经测序后得到一个长度为 1 029 bp 的序列。

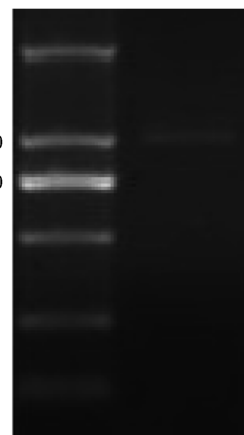
2.4 β -actin cDNA 全长序列生物信息学及系统进化分析结果

将 RT-PCR、3'RACE、5'RACE 扩增的序列进行拼接, 获得西伯利亚鲟 β -actin 基因 cDNA 全长序列(图 6)。序列分析显示: 西伯利亚鲟 β -actin 基因 cDNA 序列全长 1 322 bp, 其包括的 137 bp 的 5'端非翻译区, 57 bp 的 3'端非翻译区和编码

bp M 2000

1000

750

图 5 β -actin 3'RACE 电泳结果Fig. 5 5'RACE of β -actin gene

```

1  cccccccctttgtgttttcggggggggaataatttgcattcttcttcgggaaataggggggaaaaaaatcgtaacgataaaca  90
91  ttttttttttctaagcgggtggaagtaccacccaaactaagtcaccatggaagacgaaattgccgcactggtgttgacaacggttcc  179
1  1 M E D E I A A L V V D N G S 14
180 ggtatgtgcaaagccggtttcgtggagatgatgctccccgagctgtctcccatccatcgttgacgccaagacatcagggtgtcatg  269
15 G M C K A G F A G D D A P R A V F P S I V G R P R H Q G V M 44
270 gttggcatgggacagaaggacagttatgttgggtgatgaggtcagagcaagagaggtatcctgacctggagtaccacatcagacggca  359
45 V G M G Q K D S Y V G D E A Q S K R G I L T W S T H S S T A 74
360 ttgtcaccaactgggatgacatggagaagatctggcatcacaccttctacaatgagctgcgtgttgccctgaggagcacccgtctctgc  449
75 L S P T G M T W R R S G I T P S T M S C V L P L R S T P S C 104
450 tcacagaggtctccctggacccaaggctaacagagagaagatggccagatcatgtttgaaacctcaacacccagccattgacgttg  539
105 S Q R L P W T P R L T E R R W P R S C L K P S T P Q P L T L 134
540 ctatccaggtgtgtgtcctgtacgctctggtctgacctggtattgtgtggactctggtgatggtgtcaccacactgtgcca  629
135 L S R L C C P C T P L V V P L V L W W T L V M V S P T L C P 164
630 tctacgaaggttatgcctgccccagctatcctgccgtctggacttggtggtcgtgacctgactgactacatgaagatcctgacc  719
165 S T K V M P C P T L S C R L D L A G R D L T D Y L M K I L T 194
720 gagagaggtacagcttcaccaccacagccgagagagaaattgtcgtgacatcaaggagaagctctgctacgtcgccctggacttcgag  809
195 E R G Y S F T T T A E R E I V R D I K E K L C Y V A L D F E 224
810 cgggagatggccaccgctgcttctcttctcctccctggagaagagctatgagctgcccagcggtcaggtcatcaccatcggaacagagcgt  899
225 R E M A T A A S S S S L E K S Y E L P D G Q V I T I G N E R 254
900 tttaggtgccccgaggccctgttccagccatcctcttgggtatggaatcctgctggtatccatgagaccaccttcaactccatcatgaag  989
255 F R C P E A L F Q P S F L G M E S C G I H E T T F N S I M K 284
990 tgtgacgttgacatccgtaaggacgtgtacccaacactgtactgtctggaggtaccacatgtaccctggcattgcagacagaatgcag  1079
285 C D V D I R K D L Y A N T V L S G G T T M Y P G I A D R M Q 314
1080 aaagaatcacagccctggcactagcacaatgaaaatcaagatcattgccccacctgagcgttaatactctgtctggtatcgaggtcc  1169
315 K E I T A L A P S T M K I K I I A P P E R K Y S V W I G G S 344
1170 atcctggcctctctgtccacettccagcagatgtggatcagcaagcaggagtacgatgagtcgggcttccatcgtccaccgtaaatgc  1259
345 I L A S L S T F Q Q M W I S K Q E Y D E S G P S I V H R K C 374
1260 ttctaacagactgttaccacttcacacgccaccttaattgcgcagagggaataaaaaaa 1322
375 F ★

```

图 6 西伯利亚鲟 β -actincDNA 全长序列和氨基酸序列

注: atg表示起始密码子, 上面为核苷酸序列, 下面为氨基酸序列; taa表示终止密码子。

Fig. 6 cDNA and deduced amino acid sequences of β -actin of Siberian sturgeon

Note: atg shows initiation codon, upper sequence indicates the nucleotide and the lower shows the amino acids. taa shows termination codon.

375 个氨基酸残基的 1 128 bp 开放阅读框。

对该序列运用分子进化遗传分析软件 DNAMAN6.0, 进行分子进化分析, 经分析发现西伯利亚鲟和其他鱼的差异性不是特别大, 但是其作为较为古老的鱼类成为这个系统树的外群, 并与斑马鱼(*Danio rerio*)、鲮(*Cirrhinus molitorella*)和黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)的亲缘关系相对较近, 而和高首鲟(*Acipenser transmontanus*)、黄鳝(*Monopterus albus*)等鱼的亲缘关系相对较远(图 7)。

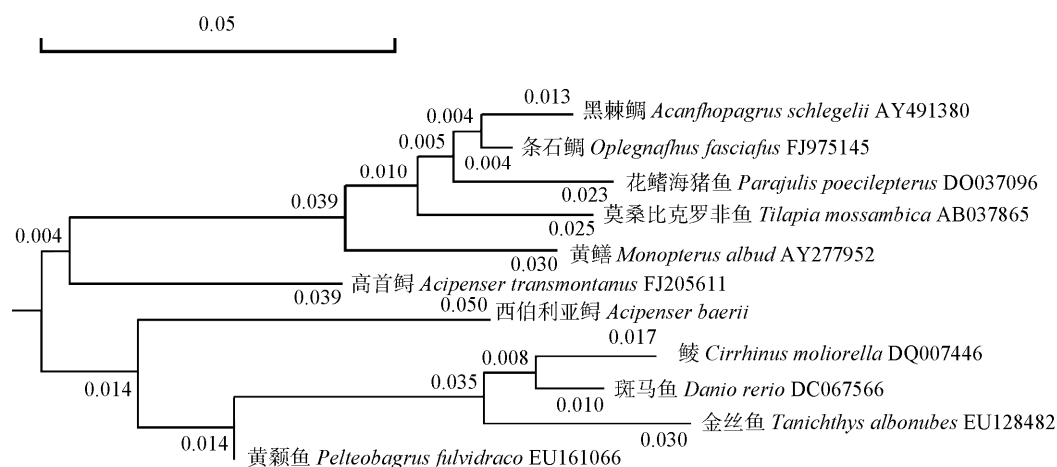


图 7 DNAMAN 6.0 构建系统树

图中数字表示遗传距离。

Fig. 7 Construction system tree by DNAMAN 6.0
Number means genetic distance.

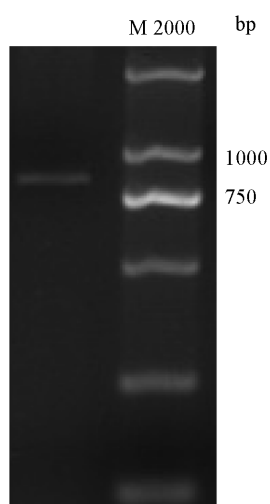


图 8 Sox2 同源区 RT-PCR 电泳结果

Fig. 8 RT-PCR result of Sox2 homology region

2.5 Sox2 同源区 RT-PCR 扩增及生物信息学分析

用设计的 Sox2 同源性引物 P9 和 P10 进行 PCR 扩增, 电泳结果显示: 在 Marker1 000 ~ 750 bp 中间有 1 条明显的目的带(图 8)。测序得到 1 个长度为 768 bp 的序列(图 9), 该序列与预测的目的片段大小相符。同时对测序结果进行 BLAST 比对, 发现该序列与施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、河鲀(*Takifugu rubripes*)的同源性分别为 99%、85%、84%、78%, 故可初步推测是西伯利亚鲟 Sox2 的

部分序列。

对该序列同样运用分子进化遗传分析软件 DNAMAN, 进行分子进化分析, 经分析发现西伯利亚鲟和施氏鲟作为较为古老的鱼类成为这个系统树的外群, 与大西洋鲑(*Salmo salar*)亲缘关系较近, 同时, 在这一系统树下也同康浪白鱼(*Anabarilius grahami*)、斑马鱼(*Danio rerio*)汇聚在一起, 同人(*Homo Sapiens*)、鸡(*Gallus gallus*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)等物种的亲缘关系较远(图 10)。

2.6 β -actin 作为 Sox2 时空差异表达内参基因的应用

以 β -actin 基因为内参基因, 运用实时荧光

```
1 atgaacgcgtttatggtgtggtcgagagggcaaaggagaaaaatggcgcaggagaaacccgaaatgcacaattcagaaatcagcaaaaga 90
1 M N A F M V W S R G Q R R K M A Q E N P K M H N S E I S K R 30
91 ctccggggccgagtggaacttttatccgaatctgagaagcgaccttttatcgacgaagccaagcggtcagagctctccacatgaaggaa 180
31 L G A E W K L L S E S E K R P F I D E A K R L R A L H M K E 60
181 caccgggattacaaatacagaccgagggcgaaacaaagacctgatgaagaaggacaagtacactctgccaggtggacttcttctgctccg 270
61 H P D Y K Y R P R R K T K T L M K K D K Y T L P G G L L A P 90
271 ggccggcaatgcgatgaacagcggggtaggtgtaggggtggcgtgggtgccgggtcaatcaaaggatggacagttatgcacatatgaat 360
91 G G N A M N S G V G V G A G M G A G V N Q R M D S Y A H M N 120
361 ggctgggccaacggaggtctatggtatgatgcaggagcagctgggctacccgcagcaccgggttttaaatcctcagacgctgcacagatg 450
121 G W A N G G Y G M M Q E Q L G Y P Q H P G L N P H S A A Q M 150
451 cagccaatgcaccgctatgacatgagcgcccttcagtacaattctatgaccaattcacagacctacatgaacgggtccccacctacagc 540
151 Q P M H R Y D M S A L Q Y N S M T N S Q T Y M N G S P T Y S 180
541 atgtcgtactcccagcagagcacccttggaatgactctgggctccatgggtgcggtgggtcaagtcagaatccagctcaagtcaccgggtt 630
181 M S Y S Q Q S T P G M T L G S M G A V V K S E S S S S P P V 210
631 gtcacatcatcctctcattcaggggtccccagtggtcagcccggggaccttcgggacatgatcagcatgtatctgcccgagctgaagta 720
211 V T S S S H S R A P Q C Q P G D L R D M I S M Y L P G A E V 240
721 ccagaatcaactgcccaaagcagacttcacatgtcacaacattaccag 768
241 P E S T A Q S R L H M S Q H Y Q 256
```

图 9 西伯利亚鲟 *Sox2* 同源区序列及推导的氨基酸序列
注: 上面为核苷酸序列, 下面为氨基酸序列.

Fig. 9 Homologous and deduced amino acid sequences of *Sox2* of Siberian sturgeon
Note: Upper sequence indicates the nucleotide and the lower shows the amino acids.

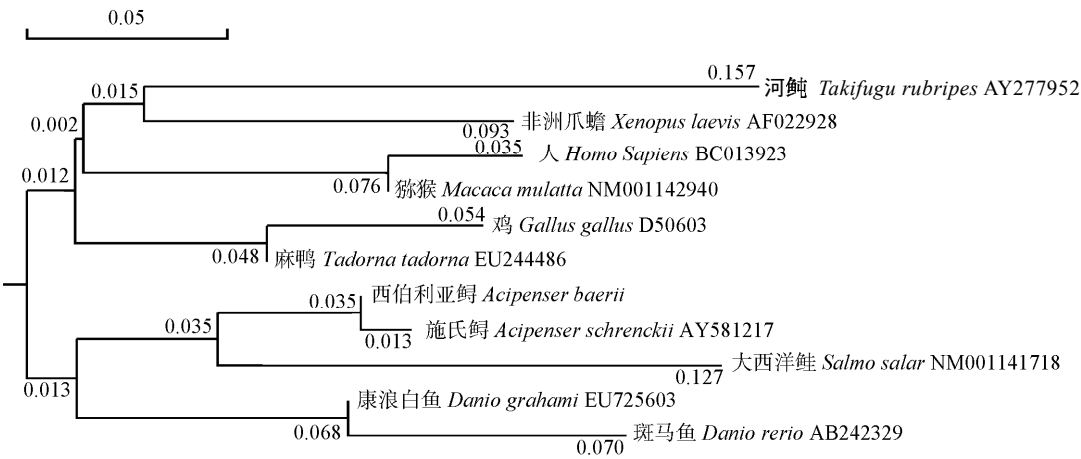


图 10 DNAMAN6.0 构建系统树
图中数字表示遗传距离.

Fig. 10 Construction system tree by DNAMAN6.0
The number means genetic distance.

定量 PCR 技术, 在西伯利亚鲟各组织当中均检测到了 *Sox2* 基因表达, 但是在不同的组织当中表达量也有一定的差异(图 11)。其中, 在肝、胰、肾、脑 4 个组织当中表达量差距不大, 均处于相对较低的水平, 唯独在肌肉组织当中, 表达量最高, 达到了肝脏当中的 10.4 倍。同时 *Sox2* 基因虽然在西伯利亚鲟胚胎发育各时期都有表达, 但表达也具明显的时间差异性(图 12)。其中, 在受精

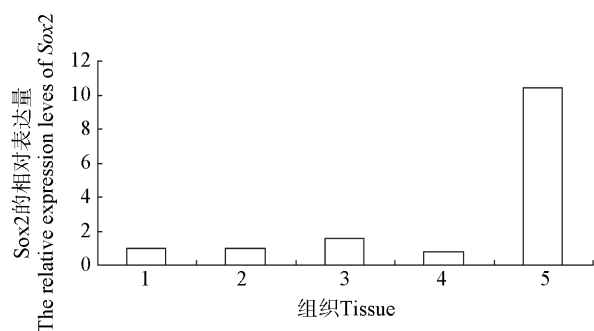


图 11 西伯利亚鲟 *Sox2* 基因在各组织相对表达量

注: 1: 肝; 2: 胰; 3: 肾; 4: 脑; 5: 肌肉。

Fig. 11 The relative expression levels of Siberian sturgeon *Sox2* gene in various tissues

Note: 1: liver; 2: brain; 3: kidney; 4: muscle; 5: pancreas.

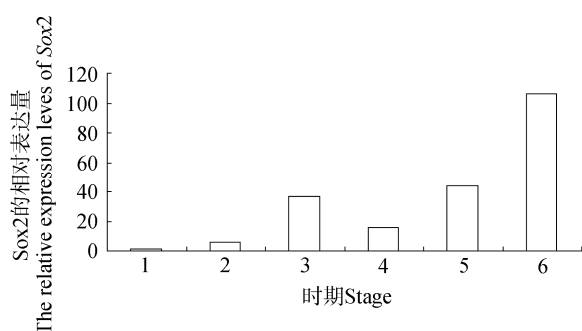


图 12 西伯利亚鲟 *Sox2* 基因在胚胎发育各时期相对表达量

注: 1: 受精卵期; 2: 囊胚期; 3: 原肠期; 4: 神经胚期; 5: 视泡形成期; 6: 心脏形成期。

Fig. 12 The relative expression levels of Siberian sturgeon *Sox2* gene in various stages

Note: 1: fertilized egg; 2: blastula stage; 3: gastrula stage; 4: neurula stage; 5: formation of visual bubble; 6: formation of heart.

卵期、囊胚期 *Sox2* 基因的相对表达量较低, 在受精卵期是 *Sox2* 基因在整个胚胎时期相对表达量的最低点。在原肠期、神经胚期、视泡形成期和心脏形成期, *Sox2* 基因的 mRNA 相对表达量达较高, 其相对表达量分别为受精卵时期的 36.7 倍、15.5 倍、44 倍和 106.2 倍, 在心脏形成期达到了最高点。

3 讨论

本研究成功地用 RACE 法克隆出西伯利亚鲟 *β-actin* 基因的 cDNA 全长。DNA 序列分析表明: 该基因全长为 1 322 bp, 共编码 375 个氨基酸, 和其他脊椎动物的 *β-actin* 基因一样, 具高度的保守

性, 特别是与其他鱼类相比, 其相似性更高, 如与斑马鱼(*Danio rerio*)、黄颡鱼(*Pelteoba-grus fulvidraco*)、鲢(*Cirrhinus molitorella*)等大多数鱼类的相似性高达 90% 以上, 氨基酸的相似性更达到 95% 以上。同时也有大量研究表明, *β-actin* 是自然界的真核生物体中普遍存在、高度保守的一类蛋白质, 主要存在于机体的细胞质中, 是细胞骨架微丝的主要组成成分, 在肌肉收缩、细胞骨架形成、细胞移动等方面起重要作用, 参与关键而又最基本生命活动的进行^[9], *β-actin* 基因能在生物体内与一些管家基因一样持续、恒量、稳定的表达, 因而在很多需量化的试验如实时荧光定量 PCR 和 Northern 杂交中其被作为内参基因^[10-12]。

同时本研究也克隆出西伯利亚鲟 *Sox2* 同源区片段, 该片段长为 768 bp, 经序列比对, 发现该同源区与大多数鱼类有着较高的相似性, 其中尤以与施氏鲟的相似性最高, 这也从另一方面反映出西伯利亚鲟和施氏鲟之间较近的亲缘关系^[1]。近年来有研究表明, *Sox2* 基因作为转录因子, 在动物神经分化发育过程中所起的重要的调控作用。同时有研究更直接地表明, *Sox2* 与其他基因一起参与了小鼠感觉基板的发育和分化^[7]。在非洲爪蟾的研究当中, 发现 *Sox2* 在早期神经板和神经管中均有极为广泛的表达, 在这里, *Sox2* 被认为强化了早期神经板细胞的命运, 促使其进一步特化。有研究也直接表明, *Sox2* 与其他基因的协同调控下使初始神经基板进一步特化为神经节^[13-14]。近来在斑马鱼的研究中检测到 *Sox2* 是其神经节支持细胞更新和增殖的关键基因, 同时, 在整个胚胎发育过程中 *Sox2* 也均有表达, 大多数学者建议将其作为神经分化发育的标志性基因^[15-16]。

以克隆出的 *β-actin* 基因作为内参基因, 运用实时荧光定量 PCR 技术, 检测到西伯利亚鲟各个组织中 *Sox2* 均有表达, 其中在肌肉当中的表达量最高, 分别达到其在肝、胰、肾、脑中相对表达量的 10 倍左右。究其原因可能是当时选取肌肉组织时取得的是在体侧的区域, 在这一部位肌肉中可能包含着较大的侧线神经节, 而 *Sox2* 是神

经节更新和增殖的关键基因,且选取的鱼处于发育生长的活跃期,随体长的加长,侧线神经节需不断的更新、增生。然而在这一时期,脑的发育已基本完成,因此在大脑中 *Sox2* 的表达水平与其他组织如肝、胰、肾的表达量相当,而在肌肉组织中却有较高量的表达^[17]。在西伯利亚鲟胚胎发育过程中, *Sox2* 基因表现出多样的动态表达模式,这与其在各种发育事件中起着重要作用是一致的。在本实验中,检测到 *Sox2* 基因在西伯利亚鲟胚胎发育的整个过程当中均有表达,这与在小鼠、鸡、非洲爪蟾和斑马鱼的研究中所获得的结论相同。有报道称从小鼠卵母细胞到最终胚胎发育完成的整个过程当中均检测到了 *Sox2* 的表达;在鸡与非洲爪蟾的胚胎发育过程当中, *Sox2* 也均有表达;该基因与其他基因互相协作,调控神经基板的分化发育,促使神经节的形成^[18-19]。本实验经比较分析,发现在原肠期、神经胚期、视泡形成期、心脏形成期与受精卵期及囊胚期相比属于表达量相对较高的时期,在神经胚期, *Sox2* 的相对表达量达到了受精卵期的 15.6 倍,特别是在后来的心脏形成期,该基因的相对表达量达到在整个胚胎时期的顶峰,其相对表达量分别达到了受精卵期和囊胚期的 106.2 倍和 18.3 倍。有研究表明;脊椎动物胚胎发育过程中,神经胚期胚胎外胚层增厚形成上皮型神经板,神经板两侧隆起形成神经,随后神经褶两侧向背中中线合拢并愈合成神经管。神经管闭合是脑和脊髓正常发育的前提,这个发育过程发生异常则会导致神经管缺陷 (Neural Tube Defect, NTD)^[20]。在心脏形成期的时候其相对表达量达到最高点,可能是在该时期神经基板和神经细胞迁移活动频繁,因为在小鼠心脏形成期的研究已经发现在该时期神经调节蛋白、生长因子等表达都处于较高时期,同时该时期心脏神经嵴细胞的正确迁移决定着心脏血管的分配等关键部位的形成^[21]。

本研究克隆出西伯利亚鲟 β -actin 基因的 cDNA 全长和 *Sox2* 基因同源区,分析了其序列特征和分子进化特点。为后续的量化基因的表达量研究提供了坚实可靠的工具,同时,借助 β -actin

基因可作为稳定内参基因的这一特点,通过实时荧光定量测定了 *Sox2* 基因在西伯利亚鲟胚胎发育不同时期的相对表达量,这为后续进一步研究该基因的功能以及西伯利亚鲟侧线神经节发育、分化和迁移的调控机理打下基础。

参考文献:

- [1] 孟庆闻, 缪学祖, 俞泰济, 等. 鱼类学[形态·分类] [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989: 147-150.
- [2] Pederson T. Half a century of "the nuclear matrix" [J]. Mol Biol Cell, 2001, 11(3): 799-805.
- [3] 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.
- [4] Krussel J S, Carlos Simon, Maria Carmen Rubio, et al. Expression of interleukin-1 (IL-1) system mRNAs in single blastomeres from human preimplantation embryos [J]. Human Reproduction, 1998, 13(8): 2206-2211.
- [5] Mitsuhiro Kurusu, Takeshi Awasaki, Liria M Masuda Nakagawa, et al. Embryonic and larval development of the *Drosophila* mushroom bodies: concentric layer subdivisions and the role of fasciclin II [J]. Development, 2002, 129(2): 409-419.
- [6] Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. Pairing Sox off: with partners in the regulation of embryonic development [J]. Trends Genet, 2000, 16(4): 182-187.
- [7] Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins [J]. Nucl Acids Res, 1999, 27(6): 1409-1420.
- [8] Hernández P P, Olivari F A, Sarrazin A F, et al. Regeneration in zebrafish lateral line neuromasts: expression of the neural progenitor cell marker Sox2 and proliferation-dependent and independent mechanisms of hair cell renewal [J]. J Neurobiol, 2007, 67(5): 637-654.
- [9] Sheterline P, Sparrow J. Actin [M]. London: Academic Press, 1994: 1-62.
- [10] Blitvich B J, Blair C D, Kempf B J, et al. Developmental and tissue specific expression of an inhibitor of apoptosis protein homologue from *Aedes triseriatus* mosquitoes [J]. Insect Mol Biol, 2002, 11(5): 431-442.
- [11] Festucci Buselli R A, Carvalho Dias A S, de Oliveira Andrade M, et al. Expression of Cyp6g1 and Cyp12d1 in DDT resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster* [J]. Insect Mol Biol, 2005, 14(1): 69-77.
- [12] Vascotto S G, Beug S, Liversage R A, et al. Nvbeta-actin and NvGAPDH as normalization factors for gene expression analysis in limb regenerates and cultured blastema cells of the adult newt, *Notophthalmus viridescens* [J]. Int J Dev Biol, 2005, 49(7): 833-842.
- [13] Kishi M, Mizuseki K, Sasai N, et al. Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early *Xenopus* neuroectoderm [J]. Development, 2000, 127(4): 791-800.

- [14] Hernández P P, Olivari F A, Sarrazin A F, et al. Regeneration in zebrafish lateral line neuromasts: expression of the neural progenitor cell marker Sox2 and proliferation dependent and independent mechanisms of hair cell renewal [J]. Dev Neurobiol, 2007, 67(5): 637–654.
- [15] Dee C T, Gibson A, Rengifo, et al. A change in response to BMP signalling precedes ectodermal fate choice [J]. Int J Dev Biol, 2007, 51(1): 79–84.
- [16] Germanà A, Montalbano G, Guerrero M C. Sox2 in taste bud and lateralline system of zebrafish during development [J]. Neurosci Letters, 2009, 467(1): 36–39.
- [17] Avilion A A, Nicolis S K, Pevny L H, et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on Sox2 function [J]. Genes Dev, 2003, 17(1): 126–140.
- [18] Nishiguchi S, Wood H, Kondoh H, et al. Sox1 directly regulates the gamma-crystallin genes and is essential for lens development in mice [J]. Genes Dev, 1998, 12(6): 776–781.
- [19] Chang Soo Hong, Jean Pierre, Saint Jeannet. Sox proteins and neural crest development [J]. Seminars in Cell Dev Biol, 2005, 16(6): 694–703.
- [20] Jeffrey A, Golden M D, Gerald F Chernoff. Intermittent pattern of neural tube closure in two strains of mice [J]. Teratology, 1993, 7(1): 73–80.
- [21] Martin Gassmann, Franca Casagrande, Donata Orioli, et al. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor [J]. Nature, 1995, 378(6555): 390–394.

Cloning and sequence analysis of Siberian sturgeon full-length β -actin gene cDNA and application of genes as a internal reference

SHI Zhiyi, CHENG Qianqian, SONG Jiakun

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: β -actin is one of the actin family, especially in maintaining cell structure, movement and physical activity in cell division and playing an important role in quantitative genetic experiments. In this study, homology cloning and RACE techniques were used to amplify Siberian sturgeon (*Acipense baerii*)'s β -actin gene cDNA full-length. Sequence analysis showed that the full-length of β -actin gene cDNA had 1322 bp, which consisted of a 1128 bp open reading frame (ORF) encoding 375 amino acids, a 137 bp 5'untranslated region (5'UTR) and a 57 bp 3'untranslated region (3'UTR). Multiple alignment analyses showed Siberian sturgeon was much closest to other fishes. Meanwhile, homology cloning method was used to obtain the Siberian sturgeon's Sox2 gene homology Sequence, which had 768 bp and shared over 70% similarity with other species. And then β -actin gene was used as a internal reference on detecting the expression of Sox2 gene in various tissues and various embryonic development periods of Siberian sturgeon by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed Sox2 gene had expressed in different tissues and the expression level of Sox2 were relatively low in liver, pancreas, kidney and brain. However, in muscle tissue, the expression level of Sox2 was highest in all of these tissues. Although Sox2 gene had expressed in various periods of the Siberian sturgeon embryo, the relative expression level of Sox2 gene was low in the fertilized egg period and blastocyst. In the gastrula, neurula period, formation of visual bubble and formation of heart, the expression of Sox2 gene reached to relatively high. At the same times, in the formation of heart, the expression of Sox2 gene reached to the highest. This research will provide a solid tool to quantify the expression of the related genes during the development of Siberian sturgeon embryo and lay a foundation for the further study on the role of Sox2 gene in the differentiation of Siberian sturgeon's ganglia and so on. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(6): 1173–1182]

Key words: Siberian sturgeon; β -actin; full-length of cDNA; RACE; Sox2; internal reference

Corresponding author: SHI Zhiyi. E-mail: zyshi@shou.edu.cn