

鲮 β -肌动蛋白基因的分子克隆及其作为分子内标的可靠性分析

张殿昌¹, 江世贵¹, 邵艳卿^{1,2}, 黄燕琴^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 水产养殖与生物技术研究室, 广东广州 510300; 2. 上海水产大学, 上海 200090)

摘要: β -actin 是 actin 家族的一员, 在维持细胞结构、细胞内运动和细胞分裂等细胞生理活动方面发挥着重要的作用。克隆的鲮 (*Cirrhinus molitorella*) β -actin 基因的 cDNA 全长 1 804 bp, 开放阅读框长 1 128 bp, 编码 375 个氨基酸, 5' 和 3' 末端非翻译区 (UTR) 分别为 94 bp 和 582 bp。RT-PCR 结果表明, β -actin 在未经 LPS 刺激的和经 LPS 刺激的鲮心脏、肾脏、肌肉、肝脏、脾脏、肠、脑和皮肤等 8 种组织中广泛表达, 表达水平没有明显差异, 可以作为基因表达调控研究的分子内标。鲮与其他鱼类 β -actin 基因编码区核苷酸序列同源性在 85.9%~99.6%。分子系统进化树分析表明, 可将鱼类分成鲤形目、鲈形目、鲉形目和合鳃目 4 大支, 与传统分类一致, β -actin 基因核苷酸序列是研究分子进化的一个很好的分子标记。[中国水产科学, 2006, 13(5): 708~713]

关键词: β -actin; 鲮; 系统发生; 分子内标

中图分类号: Q959.468 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)05-0708-06

鲮 (*Cirrhinus molitorella*) 隶属鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 中的野鲮亚科 (Labeoninae), 广泛分布于中国南方、东南亚和非洲的热带及亚热带地区^[1], 是中国南方地区重要的淡水养殖品种之一, 其产量占广东、广西池塘养殖鱼类总产量的 35% 左右, 具有产量高、抗病力强和肉质细嫩等特点, 也是中国淡水鱼加工附加值最高的品种之一^[2]。为进一步推动中国鲮养殖产业的发展, 有必要对鲮的遗传结构、繁殖和免疫等方面进行深入研究, 以便为鲮的良种培育提供基础资料。目前对鲮遗传学和分子生物学方面的研究正在开展中^[3-6]。在利用半定量 PCR 技术对鲮的基因进行表达调控研究时, 由于在材料处理和实验过程中可能存在误差, 因此需要一个可靠的分子内标, 标准化各样品和处理步骤, 使各样品间具有可比性。

肌动蛋白是一个多基因家族蛋白, 在高等动物细胞内可根据其等电点的不同分为 α 、 β 和 γ 3 种类型^[7]。 β -actin 基因在维持细胞结构、细胞内运动和细胞分裂等细胞生理活动方面发挥着重要的作用, 是一种广泛参与真核细胞各生理过程的管家基因, 在基因表达调控研究时被广泛用作分子内标^[8]。然而, 近年的研究表明, 在不同物种中 β -actin 基因的表达有时也会受不同生理状态或环境的调控而出现表达差异^[9], 因此在利用 β -actin 基因作为分子内

标时就必须首先评价其在不同的生理状态下是否存在表达差异。本研究采用 RT-PCR 及 RACE 技术克隆鲮 β -actin 基因, 并进行了序列分析; 同时比较 β -actin 在健康的未经 LPS 刺激的和经 LPS 刺激的鲮的心脏、肾脏等 8 种组织的表达水平, 研究其做为鲮基因表达调控的分子内标的可靠性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织样品 鲮 (*Cirrhinus molitorella*) 购自广州鹭江市场, 共 5 尾, 体质量约 400 g, 在室内水族箱中暂养 1 周, 观察鲮的健康状况, 待其状态稳定后进行实验。

1.1.2 宿主菌和质粒 pMD-T 载体购自 TaKaRa 公司, 大肠杆菌 DH5 α 由本室保存。

1.1.3 试剂和酶 限制性内切酶、T₄DNA 连接酶、碱性磷酸酶购自 TaKaRa 公司。RNA 提取试剂盒 Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司。逆转录试剂盒 TdT 酶和 dCTP 购自 Promega 公司。胶回收和 PCR 产物纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司。其他产品为国产分析纯。

1.1.4 引物 根据已知 β -actin 基因的保守序列设计合成 1 对引物 FW 和 RV, 利用 FW 和 RV 为引物,

收稿日期: 2005-07-26; 修订日期: 2005-10-24。

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (033102)。

作者简介: 张殿昌 (1977-), 男, 研究实习员, 从事海洋生物技术研究。E-mail: zhangdch@163.com

通讯作者: 江世贵。E-mail: jingsg@21cn.com

cDNA第一链为模板扩增β-actin基因的中间片段,然后根据中间片段序列设计引物FW1和FW2及RV1和RV2分别用于5'RACE和3'RACE;TAP为逆转录引物,AAP为接头引物,AP为锚定引物(表1)。

表1 PCR扩增引物
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')
Actin-FW	CAGACTACCTCATGAAGATCTGAC
Actin-RV	GTGTTGGCATACAGGTCCTTAAG
Actin-FW1	ACAGCCGAGAGGGAAATTGTC
Actin-FW2	TGCCAGAGGCCCTGTTCCAG
Actin-RV1	TACCGCAAGACTOCATACCCAAG
Actin-RV2	CGAAGTCAAGAGCCACATAGCAG
AAP	GGCCACGCGTGGACTAGTACGGGII GGGIHGGGIIH
AP	GGCCACGCGTGGACTAGTAC
TAP	GGCCACGCGTGGACTAGTACT ₁₇

1.2 方法

1.2.1 肝脏总RNA的提取 将活鳃断头处死,迅速取出肝脏,在液氮中充分研磨,待液氮挥发完全后,加入适量的Trizol Reagent,根据使用说明提取总RNA。利用紫外分光光度计测量260 nm的光吸收值计算总RNA的浓度;利用 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 的比值检测总RNA的纯度。用变性甲醛凝胶电泳分析所提总RNA的质量,根据28S和18S的比值判断RNA的完整性。

1.2.2 β-Actin基因的克隆 取5 μg 肝脏总RNA,以TAP为引物,按照Promega公司cDNA第一链合成试剂盒说明合成cDNA第一链。以FW和RV为引物,以1 μL cDNA第一链为模板,扩增β-actin基因约340 bp的中间片段。PCR反应总体积为50 μL,包括0.2 mmol/L dNTPs;1 μmol/L的引物;4.0 mmol/L的MgCl₂;5.0 μL的10×buffer;2 U的Taq酶。PCR反应程序为94℃变性5 min,然后是94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环,最后72℃延伸10 min。PCR产物经克隆鉴定后进行测序。为了得到全长β-actin基因,利用5'和3'RACE技术扩增两端cDNA片段。3'RACE利用cDNA第一链为模板,以FW1和AP为引物进行PCR扩增。PCR反应程序为94℃变性5 min,然后是94℃变性30 s,50℃退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环,最后72℃延伸10 min。然后取2 μL 100倍稀释的第一轮PCR产物为模板,以FW2和AP为引物进行第二轮PCR扩增,退火

温度为62℃,其他条件同第一轮PCR反应。扩增产物经克隆鉴定后进行测序。5'RACE采用加尾法,用PCR产物纯化试剂盒纯化回收第一链cDNA,然后用TdT末端转移酶在第一链cDNA3'端加poly(C)尾。以加尾cDNA为模板,以RV1和AAP为引物进行PCR扩增,退火温度为53℃,其他反应条件同3'RACE。取2 μL 100倍稀释的第一轮PCR产物为模板,以RV2和AP为引物进行第二轮PCR扩增,退火温度为60℃,其他条件同第一轮反应,扩增产物经克隆鉴定后进行测序。

1.2.3 PCR产物的克隆和鉴定 扩增产物用PCR产物纯化试剂盒纯化回收后,与pMD-T载体于16℃连接30 min,转化大肠杆菌DH5α,于含Amp、X-gal和IPTG的选择培养基上过夜培养。参照Sambrook分子克隆实验指南的方法,利用蓝白斑筛选重组子,提取重组质粒,经酶切电泳法鉴定阳性克隆进行测序^[10]。

1.2.4 序列分析和系统进化树的构建 序列测定由上海博亚生物技术有限公司完成。所测序列经手工校正后,利用DNASTAR软件对相互重叠的3个β-actin基因片段进行拼接,获得全长β-actin基因序列。利用Clustal W软件与其他已知鱼类β-actin基因核苷酸序列进行比对,然后利用MEGA3软件,依Kimura^[11]双参数法(two-parameter method)对核苷酸位点的替换数进行统计,gap处理为缺失,用Bootstrap重复1 000次计算各分支的置信度,并用最大进化距离法(Maximum parsimony method,MP)进行聚类分析构建聚类关系树。

1.2.5 β-Actin基因的组织表达分析 将鳃暂养1周状态稳定后,分别取未经LPS刺激的和经LPS刺激的鳃心脏、肾脏、肌肉、肝脏、脾脏、肠、脑和皮肤8种组织,提取总RNA,用不含RNA酶的DNA酶处理所提取的总RNA,消除DNA的污染。逆转录合成第一链cDNA,利用分光光度法测定各样品第一链cDNA的浓度,加无RNA酶的超纯水调整各样品的浓度,使其均为0.3 μg·μL⁻¹。取1 μL肌肉第一链cDNA做模板,以TF和TR为引物,进行PCR扩增。PCR反应总体积为50 μL。退火温度为55℃,其他反应条件同方法1.2.2。共进行41个循环,为了确定线性扩增反应的循环数,分别在25、27、29、31、33、35、37、39和41个循环各取2.5 μL PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,确定线性扩增的循环数。然后按优化好的循环参数分别按同样条件对未经LPS刺激的和经LPS刺激的鳃8种组织

进行半定量 RT-PCR 分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取

将提取的鲢肝脏总 RNA 利用紫外分光光度计测定 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 为 1.96, 甲醛变性凝胶电泳结果显示有 28S 和 18S 2 条清晰的条带, 浓度比约为 2:1 (资料未显示), 说明提取的总 RNA 完整性良好, 符合 RACE 扩增的质量要求。

2.2 鲢 β -Actin 基因的克隆和测序分析

以 FW 和 RV 为引物进行 PCR 扩增。电泳结果显示, 在约 340 bp 处有一明显的条带, 与预期扩增的鲢 β -actin 基因中间片段大小相符。测序结果表明, 该片段长 338 bp, 经 Blastn X 比对分析证实其为鲢 β -actin 基因的部分序列。利用 5' 和 3' RACE 技术分别进行 2 轮 PCR 扩增, 各获得了约

760 bp 和 1 130 bp 的片段, 经测序证实其均为鲢 β -actin 基因的部分序列。利用 DNASTAR 软件并借助手工调整将 3 段序列进行剪接获得了长 1 804 bp 鲢 β -actin 基因全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号: DQ007446), 由 94 bp 的 5' 末端非翻译区 (UTR), 1 128 bp 的开放阅读框 (ORF) 编码区和 582 bp 的 3' 末端非翻译区, 包括起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA, 以及 1 个典型的 PolyA 信号 AATAAA。鲢 β -actin 蛋白由 375 个氨基酸残基组成, 推测的蛋白质分子量为 41.738 kD, 等电点为 5.29。鲢 β -actin 蛋白具有 2 个核输出信号位点 (NES1, 170 - 181; NES2, 211 - 222), 其为亮氨酸 (Leucine) 丰富区域, 对蛋白质在细胞核和细胞质间的运输起重要作用^[12], 这也证明所克隆的鲢 β -actin 蛋白为细胞质型 β -肌动蛋白。图 1 是鲢 β -actin 的核苷酸序列和推测的氨基酸序列。

```

GCCTTGAGCTCTCCACACCGAGCTAGTCCGGAATATCATCTGCTGTGAACCCATTCTCTTAAGTCGACAAAACCCCA
M D D E I A A L V V D N G S G M C K A G F A
ACCTAAGTTCAGCATGGATGATGAAATTCGGCACTGGTTGTGACAAACGATCCGGTATGTGCAAGCCGGATTGCT
G D D A P R A V F P S I V G R P R H Q G V M V G M G Q
GGAGATGATGCTCCCGGTGCTGCTTCCCATCCATTGTGGGTGCGCCAGACATCAGGGTGTGATGGTTGGTATGGGACA
K D S Y V G D E A Q S K R G I L T L K Y P I E H G I
GAAGGACAGCTACGTTGGTGAACGAGGCTCAGAGCAAGAGAGGTATCTGACCCCTGAAGTACCCCATCGAGCAAGGTATTG
V T N W D D M E K V W H H T F Y N E L R V A P E E H P
TCACCAACTGGGACGACATGGAGAAGGTCTGGCATCACACCTTCTACAAAGAGCTGGTGTGGCCAGAGGAGGACCC
V L L T E A P L N P K A N R E K M T Q I M F E T F N T
GTCTGCTCAGAGAGGCCGCCCTGAACCCCAAGGCCAAGGGAAGATGACACAGATCATGTTGAGAGCTTCAACAC
P A M Y V A I Q A V L S L Y A S G R T T G I V M D S
CCCGGACATGTAAGTTGACATCCAGGCTGTGCTGTGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
G D G V P T H T V P I Y E G Y A L P H A I L R L A G
GTGATGGTGTCAACACACTGTGCCATCTACGAGGTTACGGCTGCGCCAGGCCATCTCCGCTGCGACTTGGCCCGC
R D L T D Y L M K I L T E R G Y S F V T T T A E R E I
CGTGACCTGACTGACTACCTCATGAAGTCTGACCGAGAGGCTACAGCTTCAACACAGCCAGAGGGAATTTG
V R D I K E K L C Y V A L D F E Q E M G S T A A S S S
CGTGACATCAAGGAGAGCTCTGCTATGTGCTCTTGTGCTTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
S L E K S Y E L P D G Q V I T I G N E R F R F R E A L
TGGAGAAGAGCTACGAGCTTCTGACCGACAGGTTCATCAOCTTGGCAATGAGAGGTTTCAGGTGCCAGAGGCCCTGTT
F Q P S F L G M E S C G I H E T T F N S I M K C D V D
CAGCCATCTTCTTGGGTATGAGTCTTGGGTATGATGAGACCACTTCAACTCCATCATGAAGTGTGATGTGATAT
I R K L Y A N T V L S G G T T M Y P G I A D R M Q
CCGTAAGGACCTGTATGCCAAGACTGTATTGCTGCTGGTGAACACCATGTACCTGGCATTGCTGACAGGATGCAGAGG
K E I T S L A P S T M K I K I I A P P E R K Y S V W I
AGATCACATCCCTGGCCCGAGCACAATGAAATTAAGATCATTGCCCACTGAGCGTAAATCTCTGCTGCGATCGGA
G G S I L A S L S T F Q Q M W I S K Q E Y D E S G P S
GGGTCCATCTGGCTCCCTGTCACCTTCCAGCAGATGTGGATTAGCAAGCAGGAGTATGACGAGTCTGGAACATCCAT
I V H R K C F *
CGTCCACCGCAATGCTTCTAAAGGACTGTTAOCCTTCAGCCGAGCTCAAACTGGCCAGAAAACTTCAAAAGACAC
ATTGGCCATGGCTTTTGTATTATTTGGGGCTGGACTCAGGATTTAAAACTGGAACGGGAAGGTGACCGCAATGTTTTT
GGCAATAAGCATCCCGAAGTCTACAAATGCTGAGGACTCAATGTTTTGGTTTCTTTCTTTAGTCAATTCACAAATG
TTTGTAAATGCAATGTTCCGAAGCTTATTGCTCTATGAAGGCTGCCAGTAATTGGGAGCATACTTAACATTGTAGT
ATTGTATGTAATGATGTAACAAAACGATGTTTGGGTTTTTGTACTTTCAGGCTTAAATCTTGGGTACTTTTGTCTT
GTTTTTTTCTTTGTTTCAAAAAAAGGAGCTTACCATTCAGATGTAAGGTTTTCATTCCTCCCTGGGCATATTGTA
AAGCTGTGTGAACGTGGGGGTGCCAGACATTTGGTGGGGCAACCTGTACACTGACTAATTCAATTCAATAAAAGTG
CACAAGTGTAAAGACATCTAAAAA

```

图 1 鲢 β -actin 基因 cDNA 序列和预测的氨基酸序列

注: 画线部分表示 2 个核输出信号 (NES-1, 170 - 181; NES-2, 211 - 222), 粗体表示 4 个疏水氨基酸残基。

Fig. 1 cDNA and predicted amino acid sequence of β -actin gene of mud carp

Note: Two nuclear export signals (NES-1, residues 170 - 181; NES-2, residues 211 - 222) were underlined, which contain four hydrophobic residues (in bold) (leucine, isoleucine or valine) with the characteristic spacing present in established NES sequences.

2.3 鲮 β -Actin 基因的序列比较

鲮 β -actin 蛋白编码区核苷酸序列与其他已知的鱼类 β -actin 蛋白编码区核苷酸序列进行比较。结果表明,其同源率为 85.9%~99.6%。其中鲮与鲤的同源性最高,达 99.6%,而与黄鳝的同源性最差,仅为 85.9%。根据各种鱼类 β -actin 蛋白编码区核苷酸序列同源性,利用 MEGA3 中的 MP 法构建

了系统进化树(图 2)。结果显示,系统进化树可分为明显的四大支,一支由 11 种鲤形目鱼类组成;一支由 5 种鲈形目鱼类组成;一支由 2 种鲉形目鱼类组成;另一支仅有一种为合鳃目鱼类。这种系统发育关系与传统的分类相一致。 β -actin 基因核苷酸序列可以作为脊椎动物系统发育分析的分子标记^[13-14]。

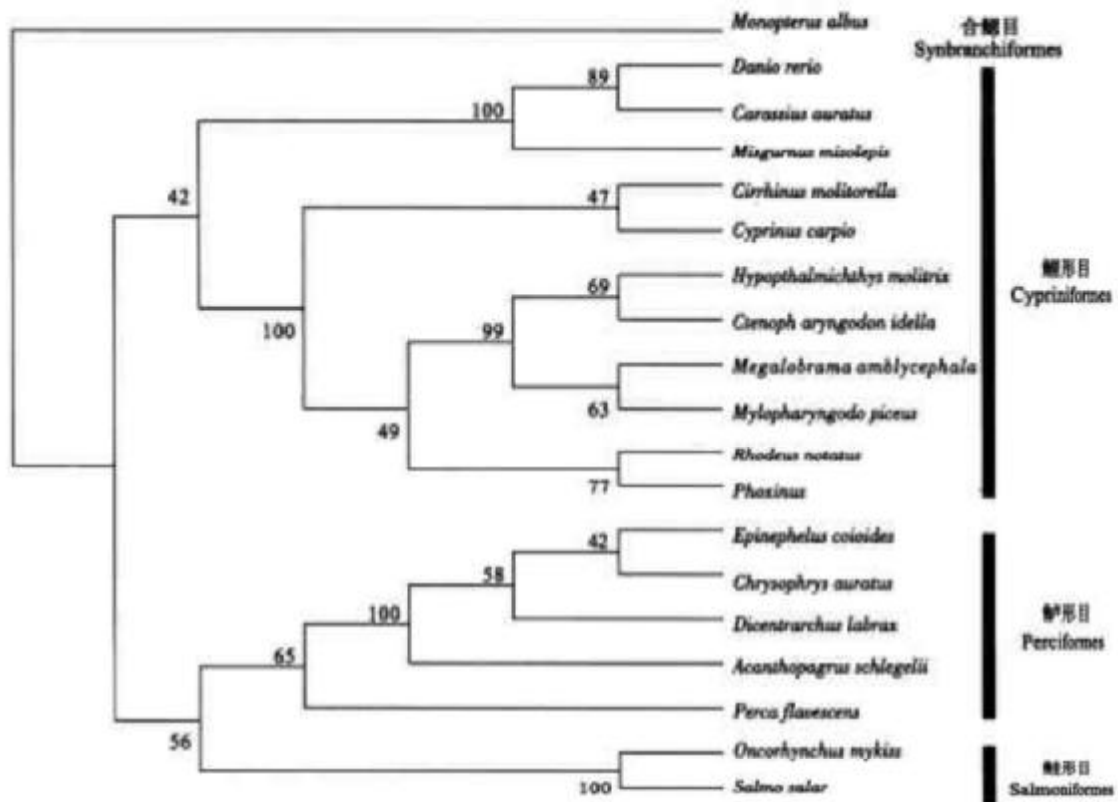


图 2 根据 β -actin 基因编码区核苷酸序列构建的硬骨鱼类系统进化树

注:分支上的数字代表 bootstrap 值;鲮(DQ007446),黄鳝(AY647143),斑马鱼(AF057040),鲫鱼(AB039726),鳊鱼(AF270649),鲤鱼(M24113),鲢鱼(AF301605),草鱼(M25103),武昌鱼(AY170122),青鱼(AY289135),高体鲮(AY302045),尖头鲮(AF200956),斜带石斑鱼(AY510710),刺鲀鱼(AY039657),欧洲鲈鱼(AJ537421),黑鲷(AY491380),金鲈(AY332493),虹鳟(AF157514),大西洋鲑(AF012125)。

Fig.2 Phylogenetic tree of the teleost fishes β -actin based on coding sequences

Note: Numbers are bootstrap values for 1 000 trials; Mud carp(DQ007446), Swamp eel(AY647143), Zebrafish(AF057040), Goldfish(AB039726), Mud loach(AF270649), Common carp(M24113), Silver carp(AF301605), Green carp(M25103), Wuchang bream(AY170122), Black carp(AY289135), Rhodius notatus(AF302045), Phoxinus phoxinus(AF200956), Orange-spotted grouper(AY510710), Squirefish(AY039657), European seabass(AJ537421), Black sea bream(AY491380), Yellow perch(AY332493), Rainbow trout(AF157514), Atlantic salmon(AF012125).

2.4 β -Actin 基因的组织表达分析

在对鲮免疫相关基因的表达调控研究时,为寻找较为可靠的分子内标,本研究采用同源克隆和

RACE 技术克隆了鲮 β -actin 基因 cDNA 序列,设计 1 对引物,利用 PCR 技术研究 β -actin 基因在未经 LPS 刺激的和经 LPS 刺激的鲮的 8 种组织中的表

达水平,各组织样品分别经29个PCR循环,PCR产物经电泳检测(图3)。结果表明,未经LPS刺激的和经LPS刺激的鲢各组织样品 β -actin基因均为组成型表达,表达水平没有明显的差异,适合作为基因表达水平研究的分子内标。



图3 RT-PCR检测鲢 β -actin基因在8种不同组织中的表达

Fig.3 RT-PCR detected the expression of mud carp β -actin gene in eight kinds of different tissues

3 讨论

本研究首次克隆了鲢 β -actin基因cDNA序列。序列分析表明,鲢 β -actin与其他脊椎动物 β -actin基因一样具有高度的保守性。由于 β -actin蛋白氨基酸序列具有高度的保守性,利用其作为分子标记进行系统发育分析时,系统树各分支点的置信度大都小于50%,不适宜作为系统发育分析的分子标记^[8]。本研究利用 β -actin蛋白编码区核苷酸序列进行鱼类分子系统进化分析,系统树分支点得到了较高的置信度,系统发育分析证实了各鱼类间的进化关系, β -actin蛋白编码区核苷酸序列是研究分子系统进化关系的一个很好的分子标记。

最近的研究表明, β -actin在不同的外界环境或生理条件下,其表达水平可能存在显著的差异。例如Sarmiento等^[13]对广温性的鲤(*Cyprinus carpio*)进行冷适应机制的研究中发现, β -actin基因的表达水平在冬季和夏季存在显著性差异;Barrallo等^[16]利用Northern blot和组织原位杂交对斑马鱼(*Brachydanio rerio*) β -actin基因的表达进行研究时发现, β -actin基因在脑神经细胞增殖时具有较高的表达水平。这说明在利用 β -actin基因作为内标进行基因表达研究时,首先要对其作为分子内标的可靠性进行评估。本研究利用RT-PCR技术比较 β -actin在未经LPS刺激的和经LPS刺激的鲢的心脏、肾脏等

8种组织的表达水平。结果表明,在未经LPS刺激的和经LPS刺激的鲢的8种组织中 β -actin基因表达水平没有显著性差异, β -actin基因可以作为研究鲢免疫相关基因表达谱分析的分子内标。

参考文献:

- [1] 陈湘典,乐佩琦,林人瑞.鲤科的科下分类及其亲缘关系[J].动物分类学报,1984,9(4):424-440.
- [2] 叶星,刘家照.麦瑞加拉鲮与鲢的养殖效率及抗寒能力和肌肉营养成分的比较[J].中国水产科学,1999,6(4):126-128.
- [3] 江世贵,张殿昌.鲢鱼生长激素基因cDNA的克隆和序列分析[J].中国水产科学,2003,10(2):97-101.
- [4] 张殿昌,江世贵,苏天凤,等.鲢胰岛素样生长因子-1(IGF-1)的分子克隆和序列分析[J].上海水产大学学报,2002,11(6):98-101.
- [5] 江世贵,张殿昌,吕俊霞,等.3种野鲮亚科鱼类16S rDNA基因序列分析[J].南方水产,2005,1(1):1-5.
- [6] 江世贵,张殿昌,苏天凤,等.鲢生长激素cDNA的克隆及其重组表达产物的促生长活性[J].高技术通讯,2004,12(6):23-27.
- [7] Venkatesh B, Tay B H, Elgar G, et al. Isolation, characterization and evolution of nine pufferfish (*Fugu rubripes*) actin genes[J]. J Mol Biol, 1996, 259: 655-665.
- [8] Xia L X, Cheng H H, Guo Y Q, et al. Characterization of the β -actin gene of the rice field eel and its phylogeny in fish[J]. Acta Genetica Sinica, 2005, 32(7): 689-695.
- [9] Glare E M, Divjak M, Bailey M J, et al. β -actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalizing mRNA levels[J]. Thorax, 2002, 57: 765-770.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual 2nd ed[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] Kumar M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence[J]. Mol Evol, 1980, 16: 111-120.
- [12] Itabajars da S V J, Seiki I, Chie N, et al. Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs encoding for *Boophilus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus appendiculatus* actins[J]. Veterinary Parasitology, 2005, 127: 147-155.
- [13] Lee J S, Lee S H, Gye M C, et al. The β -actin gene of two species of southern top mouth minnow (*Pseudorasbora parva*) and the common fat minnow (*Rhyacocyclops oxycephalus*) from the family cyprinidae[J]. DNA sequence, 2000, 11(3-4): 301-307.
- [14] Hwang U W, Han M S, Kim I C, et al. Cloning and sequences of β -actin genes from *Rhodeus notatus* and the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (cyprinidae) and the phylogeny of cyprinid fishes inferred from β -actin genes[J]. DNA sequence, 2002, 13(3): 153-159.
- [15] Sarmiento J, Leal S, Quesada C, et al. Environmental acclimation of the carp modulates the transcription of beta-actin[J]. J

Cell Biochem, 2000, 80(2): 223-228.

[16] Barrallo A, Gonzalez-Serrano R, Garcia-Isidoro M, et al. Differ-

ential brain expression of a new beta-actin gene from teleost fish (*Danio rerio*) [J]. Eur J Neurosci, 1999, 11(1): 369-372.

Molecular cloning and characterization of the β -actin gene of mud carp and its reliability as endogenous control

ZHANG Dian-chang¹, JIANG Shi-gui¹, SHAO Yan-qing^{1,2}, HUANG Yan-qin^{1,2}

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Attempts to develop quantitative assays of mRNA samples have led to the common use of housekeeping gene expression to normalize the data. Assays based on Northern blots and semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques are characterized by multiple steps, each introducing variation from sample to sample. In order to relate the results to each other and to the samples from which they originated, molecular biology assays need endogenous control, which are similarly influenced by the efficiency of each step. β -actin is a member of the actin family of genes, which play important roles in maintaining cytoskeletal structure, cell motility, cell division, intracellular movements and contractile processes, its expression is constitutively and ubiquitously high in all tissues, and therefore β -actin is the most widely used housekeeping gene. However, recent researches demonstrated that expressions of β -actin maybe were significantly different in the different environmental or physiological states, so the housekeeping gene need to be carefully validated before its use in such quantitative mRNA assays. In the present study, in order to quantitatively assay expression patterns of immuno-related genes of mud carp (*Cirrhinus molitorella*), we need to investigate a reliable molecular endogenous control to normalize mRNA levels. So a full-length cDNA of mud carp β -actin gene was cloned using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and RACE (rapid amplification of cDNA ends) polymerase chain reaction (PCR) (GenBank accession NO. DQ007446). The cDNA sequence of this gene is 1 804 bp in length and contains an open reading frame (ORF) of 1 128 nt encoding a 375 amino acid protein. The 5' and 3' untranslated regions of the messenger are 94 and 582 nucleotides long, respectively. RT-PCR showed β -actin gene of mud carp in heart, kidney, muscle, liver, spleen, intestine, brain and skin was expressed similarly in healthy and LPS-stimulated mud carp, suggesting an ubiquitous expression pattern and suitable for endogenous control to normalize mRNA levels. Nucleotide identities of the β -actin between mud carp and other fish species are 85.9% - 99.6%. Phylogenetic tree showed all the fishes compared were divided into four branches, which was similar to the traditional taxa. The β -actin may be a good phylogenetic marker in fish taxonomy. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(5): 708-713]

Key words: β -actin; *Cirrhinus molitorella*; phylogeny; endogenous control

Corresponding author: JIANG Shi-gui. E-mail: jiangsg@21cn.com