

鲮 β -肌动蛋白基因和启动子的克隆及序列特征分析

张殿昌^{1,2}, 邵艳卿¹, 苏天凤¹, 江世贵¹

(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. 上海水产大学生命科学学院, 上海200090)

摘要: 鲮(*Cirrhinus molitorella*)是华南地区重要的淡水养殖品种之一,但是鲮生长速度慢,且不耐低温,是目前鲮养殖产业所面临的主要问题。作为利用转基因技术培育快速生长鲮新品系研究工作的一部分,本实验利用PCR和一种新的染色体步移方法克隆了鲮 β -肌动蛋白(β -actin)基因启动子和全基因组DNA序列。鲮 β -actin基因长4 351 bp,由6个外显子和5个内含子组成。鲮 β -actin基因启动子区域包含1个TATA盒,1个CCAAT盒,2个CArG调控元件和1个CRE调控元件,并且鲮 β -actin基因内含子1中也含有一个CArG调控元件。这些结构特征说明本研究克隆的鲮 β -actin基因序列具有典型的启动子特征。鲮 β -actin基因启动子的克隆为转基因鲮表达载体的构建提供了一个重要的调控结构元件。[中国水产科学,2007,14(3):345—351]

关键词: 鲮; β -肌动蛋白;启动子;序列特征;转基因鱼

中图分类号:Q959.46

文献标识码:A

文章编号:1005—8737—(2007)03—0345—07

鲮(*Cirrhinus molitorella*)隶属鲤形目(Cypriniformes)鲤科(Cyprinidae)中的野鲮亚科(Labeoninae),广泛分布于中国华南地区、东南亚和非洲的热带及亚热带地区^[1],是中国华南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、抗病力强和肉质鲜美等特点,其适合制作罐装食品和鱼丸,是中国淡水鱼加工附加值最高的品种之一^[2]。但是鲮生长速度慢,且不耐低温,制约了鲮养殖产业的发展^[3—4]。因此,通过改善鲮的种质以提高鲮的生长速度是当前鲮育种工作中的一个重要研究方向,而基因工程技术的日趋成熟,为转基因鲮的培育提供了一条有效的途径。

转基因鱼技术是快速改善水产养殖品种特性的有效途径,而高效启动子区域的分离和鉴定是构建转基因鱼载体的重要环节。目前在转基因鱼中使用的启动子主要有虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)金属硫蛋白A和B基因^[5]、斑马鱼(*Danio rerio*)肌浆球蛋白重链基因^[6]、大洋鲱鱼(*Macrozoarces americanus*)抗冻蛋白基因^[7]和鲤鱼(*Cyprinus carpio*) β -actin基因^[8]等基因的启动子。 β -actin基因启动子是在转基因鱼研究中最为广泛应用的启动子之一,目前分离鉴定了鲤

鱼(*C. carpio*)^[8]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[9]、青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)^[10]、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[11]和泥鳅(*Misgurnus mizolepis*)^[12]等几种鱼类的 β -actin基因启动子,并应用于转基因鱼研究,结果表明 β -actin基因启动子能够驱动目标基因的高效表达,是构建转基因鱼表达载体最好的启动子之一。为了利用转基因技术培育鲮快速生长新品系,本研究在克隆了鲮生长激素^[3]、胰岛素样生长因子^[4]和 β -actin基因cDNA序列^[13]的基础上,采用PCR和一种新的染色体步移法,克隆了鲮 β -actin基因启动子,并对其基因组结构和启动子特征进行了分析。该基因的成功克隆为构建转全鱼基因鲮表达载体奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 基因组DNA提取

取约100 mg鲮肌肉组织置于2 mL离心管中,用剪刀剪碎,加500 μ L消化缓冲液(20 mmol/L Tris-Cl, PH8.0; 5 mmol/L EDTA, PH8.0; 400 mmol/L NaCl; 1% SDS; 200 μ g/mL蛋白酶K),于55 $^{\circ}$ C水浴消化过夜,然后用酚/氯仿和氯仿抽提,用0.2倍体积的醋酸铵和0.5倍体积的异丙醇沉淀,经70%的乙醇

收稿日期:2006—08—16; 修订日期:2006—11—20.

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(033102);国家科技基础平台建设项目(2005DKA21103).

作者简介:张殿昌,男(1977—),博士研究生,从事海洋生物技术研究. E-mail:zhangdch@163.com

通讯作者:江世贵. E-mail:jiangsg@21cn.com

洗涤后,溶于 100 μL TE 缓冲液中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 β -肌动蛋白基因的克隆

根据已克隆的鲢 β -actin 基因 cDNA 序列,分别在 5'UTR 区和 3'UTR 区设计引物命名为 Actin-FW (5'-TATCATCTGCTTGTAACCCATTCTC-3') 和 Actin-RV (5'-AAGTGGTAACAGTCCGTT-TAGAA-GC-3')。以鲢基因组 DNA 为模板,以 Actin-FW 和 Actin-RV 为引物,扩增鲢 β -肌动蛋白基因组 DNA 片段。PCR 反应总体积为 50 μL ,包括 0.2 mmol/L dNTPs; 1 $\mu\text{mol/L}$ 引物; 4.0 mmol/L MgCl_2 ; 5.0 μL 10 $\times$ buffer 和 2U Ex-Taq 酶。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 割胶纯化, 与 pMD18-T 载体连接后转化大肠杆菌 TOP10, 进行蓝白斑筛选和 PCR 鉴定后进行测序。

1.3 β -肌动蛋白基因启动子的克隆

根据已克隆的鲢 β -actin 基因组 DNA 序列, 设计合成两条巢式 PCR 引物, 分别为 Actin-R1 (5'-GC-CAGAGTCGTAGGGTTC-3') 和 Actin-R2 (5'-GAACCGTCATTCCACCT-3')。锚定引物为 AAP (5'-GGCCACGCGTCGACTAG-TACGGGGGGGGGGGGGGG-GG-3') 和 AP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3')。首先以基因组 DNA 为模板, 以 Actin-R1 为引物进行单链 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 50 μL , 包括 0.2 mmol/L dNTPs; 1 $\mu\text{mol/L}$ 的引物; 4.0 mmol/L 的 MgCl_2 ; 5.0 μL 的 10 $\times$ buffer; 2U 的 Ex-Taq 酶。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。单链 PCR 产物经 PCR 产物纯化试剂盒(杭州 V-gene 公司)纯化回收后进行加尾反应。用 TdT 末端转移酶(TaKaRa)在单链 DNA 3'端加 poly(C)尾。以加尾单链 DNA 为模板, 以 Actin-R1 和 AAP 为引物进行 PCR 扩增, 退火温度为 53 $^{\circ}\text{C}$, 其他反应条件同单链扩增反应, 然后取 2 μL 100 倍稀释的第 1 轮 PCR 产物为模板, 以 Actin-R2 和 AP 为引物进行第 2 轮 PCR 扩增, 退火温度为 52 $^{\circ}\text{C}$, 其他条件同第 1 轮反应。参照文献[14], PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳, 切取 1~2 kb 区域的凝胶并回收 DNA, 将回收产物连接到 pMD18-T 载体

中, 转化大肠杆菌感受态细胞, 经蓝白斑筛选鉴定阳性转化子。然后用正向引物 Actin-FW 和反向引物 Actin-R2 对经蓝白斑筛选的 20 个阳性转化子进一步作 PCR 鉴定, 如果插入片段含有鲢 β -actin 基因启动子序列, 就会扩增出约 320 bp 的 DNA 片段。

1.4 序列分析

利用软件 DNASTAR 将所克隆的两段鲢 β -actin 基因组 DNA 序列拼接成全基因组 DNA 序列; 利用软件 GenScan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>), 结合序列比对预测鲢 β -actin 基因内含子和外显子的拼接位点; 利用软件 PromoterScan (<http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/proscan/>) 预测启动子区域结构特征; 利用数据库 TransFac (<http://www.gene-regulation.com>) 分析启动子区域顺式调控元件; 利用软件 Cluster X 和 MEGA3.1 将鲢 β -actin 基因启动子序列与 GenBank 中鲤鱼、草鱼、青鱼、罗非鱼、青鳉 (*Oryzias latipes*)、泥鳅和东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 的 β -actin 基因启动子序列进行比对和分析。

2 结果与分析

2.1 β -肌动蛋白基因和启动子的克隆

以 Actin-FW 和 Actin-RV 为引物, 以鲢基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增, 得到了 1 条约 3.0 kb 的条带, 经克隆测序证实其为鲢 β -actin 基因组 DNA 序列。为了进一步克隆鲢 β -actin 基因启动子序列, 采用锚定 PCR 方法进行染色体步移, 以基因特异性的 Actin-R1 为引物, 进行单链延伸, 单链 PCR 产物经纯化后在单链的 3'末端加 Poly(C)尾, 然后以基因特异性引物 Actin-R1 和带有 Poly(G)的锚定引物 AAP 进行 PCR 扩增, 再以基因特异性引物 Actin-R2 和锚定引物 AP 进行巢式 PCR 扩增后, 经电泳检测可知单链泳道没有可见的 PCR 产物, 经双链扩增后 PCR 产物在 500~2 000 bp 区域呈弥散状, 切取 1 000~2 000 bp 处凝胶, 回收 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接后, 进行 PCR 检测, 结果表明在随机挑取的 20 个克隆中, 有 18 个为阳性克隆(即含有目的基因片段), 阳性率达 90%; 插入片段的长度在 900~1 800 bp 之间, 说明具有较长的步行距离。取含有最长插入片段的阳性克隆进行测序, 结果证明其含有鲢 β -actin 基因的启动子序列, 启动子序列长度约为 1 350 kb。图 1 为利用锚定 PCR 方法进行染色体步移的示意图。

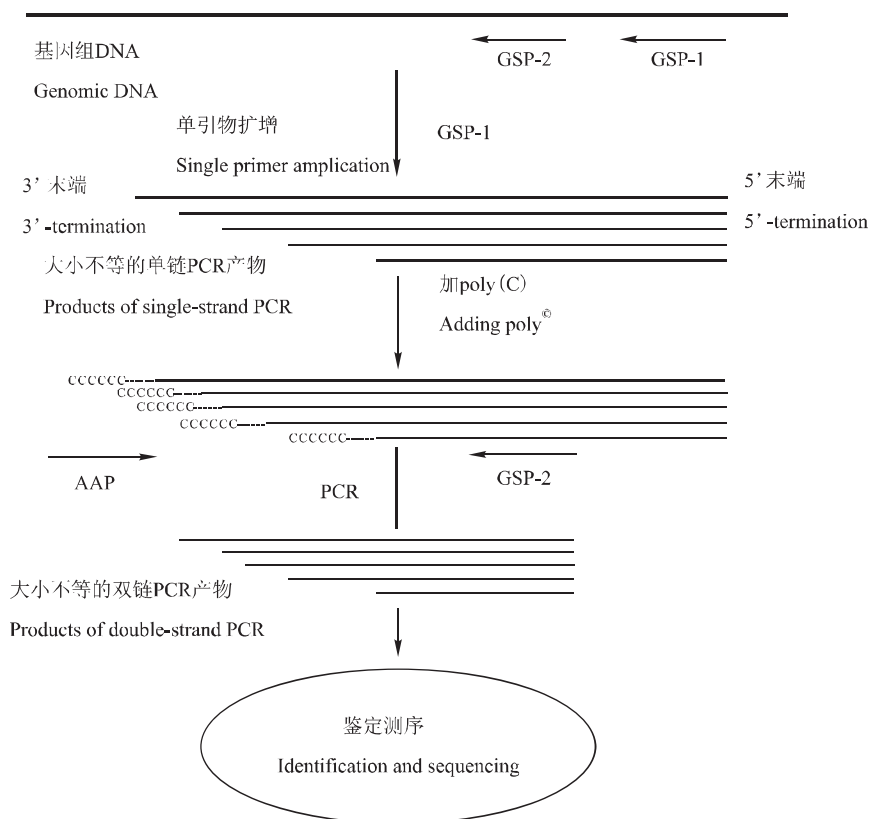


图1 利用锚定PCR法进行染色体步移示意图

Fig. 1 Gene walking using anchored PCR method

2.2 β -肌动蛋白基因序列分析

将所克隆的鲮 β -actin 基因(约 3 000 kb)和启动子序列(约 1 350 kb)利用 DNASTAR 软件并借助于手工拼接,共获得 4 351 bp 的鲮 β -actin 基因序列(图 2),该基因序列在 GenBank 的登录号为 DQ241809。与其他鱼类 β -actin 基因结构相似,鲮 β -actin 基因也由 6 个外显子和 5 个内含子构成。其中-1 173~-1 为启动子区域,1~87 为外显子 1,共 87 bp;1 454~1 583 为外显子 2,共 130 bp;1 686~1 952 为外显子 3,共 240 bp;2 236~2 674 为外显子 4,共 621 bp;2 767~2 948 为外显子 5,共 182 bp;3 031~3 178 为外显子 6,共 148 bp;88~1 453 为内含子 1,共 1 366 bp;1 584~1 685 为内含子 2,共 102 bp;1 953~2 235 为内含子 3,共 310 bp;2 675~2 766 为内含子 4,共 92 bp;2 949~3 030 为外显子 5,共 82 bp。鲮 β -actin 基因开放阅读框(ORF)共 1 128 bp,编码由 375 个氨基酸残基组成的蛋白,推测的蛋白质分子量为 41.738 kD,等电点

为 5.29。鲮 β -actin 蛋白具有两个核输出信号位点(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^[15],说明本研究所克隆的鲮 β -actin 蛋白为细胞质型 β -肌动蛋白。

鲮 β -actin 基因启动子区域具有典型的脊椎动物启动子结构特征,-28~-31 为 TATA 盒,-55~-64 为 CArG 顺势调控元件,-90~-94 为 CCAAT 盒。此外,在启动子的上游区域还有一个 CRE 结合位点和一个 CArG 顺势调控元件,并且在内含子 1 中也含有一个保守的 CArG 顺势调控元件,对于增强 β -actin 基因的表达具有重要作用^[7]。鲮与其他鱼类 β -actin 基因启动子区域的序列比对结果(图 3)表明,已知鱼类的 β -actin 基因启动子调控元件具有高度的保守性,都具有 CCAAT 盒、CArG 基序和 TATA 盒 3 个顺势调控元件,且所处的位置相似。

ATCAGATGAACAAAACATTAATATAAGCCACAAAACCAGCTATCCATGATATCAGCAGGAGATTTTGACATAATCAGCT
GTTTTGTTTATAACTGCCATTTGAAGGCCATGTGCATTACTCCCAAGTTACACATTAATAAGTACATGTTGCCCTCACA
CATCACTGCTGTTCAGCACAGCCTTATCTATCATTTCAAAGCAGTGGAACATCTTAAATGTGCAATAAATATTTTATT
CAACGAAGTTGACCATGAACGCCTGCACTGTTTTATATACGCTCAAGATTTATTATAATTATTATAAACCTCTCCAACG
AACAAGTTAATTAGTCTGTATGGATGATAAATCAATAATGTGTAATATATTTTTGAACAAGAACTAGACTGCCATACAA

SRF

GGCGTTTCAATAGCCAAGACATTGACTTGAATGCTAACAGTCAATGGCAAATATAAACCTGGGTTAGGCCCACTTACAGCC
ATCAACATCTACTATCACTCCCTTTATCATCATAACGTAACATGCACACACCTAAGCACGTAATAATTTTTACTCTGTGA

CRE

ATTCTGCGTAGGCAACTCACAATTACAGGAATGCAAGCCTGATTCAATCCAGGTTTCACTGAACCTTTCAGCAACACATT
ACCTCATGAACCTCAGAGCAGCTAGCTACTCCGTTTCGTTTCAATGAAAAATACCTTATTTTGCATAGAAAAGTACTTG
GTAGACTACCACACAGGAGTATAATTATATTATGCAAAATACAATAAGATGTAAATGACCTACAGAGTAGGTTGTAAACA
CAACAAGATCAAAAGAGGTGTCCACCCTATGACCAAAAACCTAGCATTTGTAACCTTTGTACAGACTTTCTGAACGGCTGA
AACGAACCTTCAATGGCGTTCACACAAAACGCTTAAATACGGAACCTGTGTATTAACCGGCAAAATAAAAAGGCAATT
TTGATAAAAATCGCCTAGGCCTGTGTTCTTCAAAATGGTCTAGCTTCCCTTCTTCACTCTCAAGTTGCAAGAAGCAAGTG
TAGCAATGTGCACGCGACAGCCGGGTGTGTGACGCTGGAACCAATCAGAGCGCAGAGCTCCAAAAGTTTACCTTTTATGGC

CTF

SRF

TAGAGCCAAGCATATGCCGTCGTATAAAAGAGTGCGCCAGCATTTCAACCTCACTTTGAGCTCCTCCACACGACGCTAG
TGC

TBP

Actin-FW
TGTGGAATATCATCTGCTTGTAAACCACTTCTTAAAGTCGACAAAACCCCCAAACCTAAGCTGAGTTGATTTCTAAGCTT

TTTATTACATTTTAAATTGGTTAATAATAAAATTCAAACGTTTAAATTAGAACGTACACATAAAGAGATTAAGTTACTAGA
CTCCGTTAACTAAACGTCACCGGTCTTTTTGCGAGTTAAGTAACCTTAAAGTTAGAAGCTTCGCTTCAAACTGCAGTTGTT
CTTTATTCAGTTGTTATCTTTATAAAGGTCTTTTGTATTATCATAACTCTATGTAAAGTTACTGGATATGTACAGTGGA

ATGACGGTTCCTGTTGTAGACACGACGTTGAATGGGCCGGTGTGAAATAAGCATTCAACCTTTTAACCTTAAGATGTGC
Actin-R2

TTTGGTTAGCAAAAGATTTAACCCTATATAATGTGAATTTTTTTTTTTTGTGTTTTTTTTTTTTTTTGTACTGTTTTTAAAGA
CTAGTGAGGCATGTTGCACACTTGATGGATAGCCGGCATGGGAAGTTCTTTGTGCAGGCAGTGCTGCAGCAGGGTGTGAC
CTACTTTAGCTAGCCGGCTAACCCAGTATTCATCTGCTTTAAACCTGATGAATCTAATATTCATCACTTTGACTTCTAAAA
GATCAATGGCTATTCCTCGCTTTCAGCTCGTCTGACACTTTTGTGAAAAAATAAAAAAACAACAAAAAGCTTTTAA
TATTAAGTGTGCAGACTTTCAGTCTTTAAGACTGAATAAGGTTATTCAGTATTTTATTTACTATTTAAACGTTGTTA
AAAGCAAGGTAACGTTAAGTTAGTCAGTTTTATACTGGTTTGTGTTCTGATTAGACTTGAATTGTAGTTGTAAATTATG
TCAAGAAAGAAAAAATAAATCCATTGATGAAGGCTATTATTGTAAAAATGAATGGGCTGAGGAAGATCGTTTCAAAAGTGCT
TTAGTGTGAAGTCCGCTCCTAAGGAGTCACTGAAGTGAAGTGCAGTCTGTGACGCAAGTATTCGGGCAGACACCCGTCG
AAATTCGGTTGTGAATTGATACAGCGAGGATCGAAGAGGATGTAAAACTTCATTTGTGTAGAATTTAGGGAGTGGCC
CCTGGCGTGATGAATGTCGAAATCTGTTCCTTTTTACTGAACCTACGACTCTGGCTGAGTGCCACACCGCCGGCAGCCG

Actin-R1

CAAAGCGGCTCAAACCATTTGCTTTTATGGTAATAATGAGAGAATGCAGAGGGAAGTTTCTTTGTCTGGCATATCTGAGGC
SRF

GCGCATTTGCTACTCTAGCACCAGCTAGCGGTGAGCTGTAGATTGCAGCACGAAACAGGAAGTTGACTCCACATGGTCAAC
ATGCTCACTGACATGCTCTTCTGTGGCAGCGGTGCACTTCTAAACGGTTTTCTCATTCTTTTAGAGTTTCAAGCCATGGATG

M D

ATGAAATTGCCGCACTGGTTGTTGACAACGGATCCGGTATGTGCAAAGCCGGATTGCGTGGAGATGATGCTCCCCGTGCT
D E I A A L V V D N G S G M C K A G F A G D D A P R A
GTCTTCCCATCCATTGTGGGTGCCCCAGACATCAGGTTGAGAACTGAGGCTTAATAATAAAGAAATGAGAATTATTTTT
V F P S I V G R P R H Q
TGCTTTTATGTTCCCTTTTTTAAACGTGTATCTAAATTTATTTTATTTCTCTACAGGGTGTGATGGTTGGTATGGGAC

G V M V G M G

AGAAGGACAGCTACGTTGGTGACGAGGCTCAGAGCAAGAGAGGTATCCTGACCCTGAAGTACCCCATCGAGCAGGTATT
Q 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
GTCACCAACTGGGACGACATGGAGAAGGTCTGGCATCACACCTTCTACAACGAGCTGCGTGTGCCCCAGAGGAGCACCC
V T N W D M E K V W H H T F Y N E L R V A P E E H P
CGTCTGCTCACAGAGGCCCCCTGAACCCCAAGGCCAACAGGGAAAAAGATGACACAGGTAATTTTATTTTATTATCAAA

Q

V L L T E A P L N P K A N R E K M T Q
TGGTTGTTGTCTCATCTATCCTGTTATCTTTAAGTTCTTCTATTTATTCATTTCATTTCATTTCATTTCCTCCAGG
CTTTGTGCTCTGAGCTCCTGAGTTTCTCATCTTTTGTGGAAGCAGCAGGTTATTTACTTTGCTGCTGCTGTTTGC
AGTTTCCTTCCACACTCTTGTCTTTCTGCACTTTTATTACTTCCAACCTAAGTCTGCTGATGATGTTGGGATGTTGTGC
CGCATCCGCTTTGAGCATAGTTAACTTCCCAACTCTTTCTTTTCCAGATCATGTTTCGAGACCTTCAACACCCCCGCCAT

I M F E T F N T P A

GTACGTTGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTGTATGCCCTCTGGTCTGACTACTGGTATCGTGATGGACTCTGGTGATGGTG
M Y V A I Q A V L S L Y A S G R T T G I V M D S G D G
TCACCCACTGTGCCCCATCAGAGGGTTACGCCCTGCCCCACGCCATCCTCCGTCTGGACTTGGCCGGCCGTGACCTG
V T H T V P I Y E G Y A L P H A I L R L D L A G R D L
ACTGACTACCTCATGAAGATCCTGACCGAGAGAGGCTACAGCTTACCACCACAGCCGAGAGGGAAATGTCCGTGACAT
T D Y L M K I L T E R G Y S F T T T A E R E I V R D I
CAAGGAGAAGCTCTGCTATGTGGCTCTTGAATTCGAGCAGGAGATGGGCACTGCTGCTCCTCCTCCTCCTGGAGAAGA
K E K L C Y V A L D F E Q E M G T A A S S S S L E K S

GCTACGAGCTTCCTGACGGACAGGTCATCACCATTGGCAATGAGAGGTTGAGGTGCCAGAGGCCCTGTTCCAGCCATCT
 YE L P D G Q V I T I G N E R F R C P E A L F Q P S
 TTCTTGGCTAGGTATCCTGACAAACATTATCTGGCCTGTGTAAGTATTTGAGAATGATTAGAAGAATGTGGACTGACC
 F L
 ATTCTCCTTCCTTTTGGCTATGGAGTCTTGGCGTATCCATGAGACCACCTTCAACTCCATCATGAAGTGTGATGTCGA
 G M E S C G T H E T T F N S I M K C D V
 TATCCGTAAGGACCTGTATGCCAACACTGTATTGTCTGGTGGTACCACCATGTACCCTGGCATTGCTGACAGGATGCAGA
 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
 AGGAGATCACATCCCTGGCCCCCAGCACAATGAAAATTAAGGCTGAGCTGTGCTCTGAGCTTTGATCGTTACCTTTTATAT
 K E I T S L A P S T M K I K
 GACTCCATAGCTGATGTGTGGCTAATTGTTCGTCTCCCAAGATCATTGCCCCACCTGAGCGTAAATACTCTGTCTGGA
 I I A P P E R K Y S V W
 TCGGAGGGTCCATCCTGGCCTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATTAGCAAGCAGGAGTATGACGAGTCTGGACCA
 I 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
 TCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAAACGGACTGTACCACTT
 Actin-RV
 S I V H R K C F *

图2 鲮 β -actin 基因序列及启动子区域特征

划线部分分别代表 SRF、CRE、CCAAT 盒、TATA 盒顺势调控元件;方框代表内含子/外显子拼接位点;黑体字母代表外显子序列;
 * 代表终止密码子。

Fig. 2 Structure and characterization of *C. molitorella*'s β -actin gene and promoter region

The consensus sequences of SRF, CRE, CCAAT box and TATA box are underlined; the intron/exon splicing sites are boxed; the ex-
 on sequences are showed using bold characters; the stop codon are represented by *; the primer sites are indicated with arrows.

	CCAAT box	CArG motif	TATA box
MC	GTGTGTGACCTGGACCAATCAGAGCGCAGAGCTCCAAAGTTTACCTTTTATGGCTAGAGCCAAGCAT--ATGCCGTCTGATAAAGA-GTGGGCCAGCATTTCAC		
CC	G.....	GG--..-C.....A.....-C.....G.C...G-	
GC	G.....G.....	GG--..-A.....A.....-CT.....T.....	
BC	G.....G.....	GG...--.....A.....-CT.....T.....	
NT	...A.....C.....GAG..GC..AT..G.....	G...A--CC..A..TGA.....ATCAA.....CAGC..AACGG	
ML	...GAC...ACT..G.....C..T...TCGATG..G.....A.....AAG...T..G..C..GC--CGCA..CGG.....ATA...-A...GC..TCACG--		
JM	...A.....C..TGC..GCGAT..G.....AA.....GG...A--CG..A..GAC.....TACCAC..T.....CGGC..AGC..A		
PF	...CA.....AG...CGAT..G.....C.....GG...AGCT..A..C..A.....G..CCAA.....CA...CCG..G		

图3 几种鱼类 β -actin 基因启动子区域序列比对分析

MC: 鲮(DQ241809); CC: 鲤(M24113); GC: 草鱼(M25013); BC: 青鱼(AY289135); NT: 罗非鱼(AY116536); ML: 泥鳅
 (AF270649); JM: 青鳉(S74868); PF: 东方鲀(U37499)

Fig. 3 Sequence alignment analysis of β -actin promoter among several fish

MC: *C. molitorella* (DQ241809); CC: *C. carpio* (M24113); GC: *C. idella* (M25013); BC: *M. piceus* (AY289135); NT: *O.
 mykiss* (AY116536); ML: *M. mizolepis* (AF270649); JM: *O. latipes* (S74868); PF: *T. rubripes* (U37499).

3 讨论

克隆已知 DNA 片段侧翼序列最常用的方法主要有反向 PCR (Inverse PCR)^[16]、连接介导的 PCR (Ligation-mediated PCR)^[17] 和随机引物 PCR (Randomly primed PCR)^[18] 等方法。反向 PCR 需要酶切基因组 DNA, 然后在连接酶的作用下使酶切产物自身环化, 此方法效率低, 且比较繁琐。连接介导的 PCR 依赖于目的 DNA 片段两侧的限制性酶切位点, 而随机引物 PCR 所能获得的片段通常较小, 并

且常常会产生很多非特异性的扩增产物, 大大降低了实验效率。本研究根据同聚物加尾原理设计了一种锚定 PCR (Anchored PCR) 技术, 可用于从复杂基因组中高效克隆已知 DNA 片段的侧翼序列, 不需要进行限制性内切酶消化或连接反应, 大大简化了操作步骤, 缩短了操作时间; 且扩增的特异性高。本实验中获得的阳性克隆的比率高达 90%; 有较长的步行距离, 1 次可获得 1.8 kb 左右的目的片段。

本研究克隆了鲮 β -actin 基因 DNA 序列, 并分析了其基因组结构和启动子区域特征。与其他脊椎

动物 β -actin 基因组结构相似, 鲮 β -actin 基因也由 6 个外显子和 5 个内含子组成, 其中外显子 1 编码 5' 末端调控区域, 外显子 2 编码部分 5' 末端调控区域和 41 个氨基酸残基, 外显子 3 编码 80 个氨基酸残基, 外显子 4 编码 146 个氨基酸残基, 外显子 5 编码 61 个氨基酸残基, 外显子 6 编码 47 个氨基酸残基和 3' 末端调控区域。所有 5 个内含子的起始位点均为 GT 二核苷酸, 末端为 AG 二核苷酸, 这种 GT/AG 结构为外显子的拼接提供了识别位点。

对鲤鱼^[7-8]、罗非鱼^[11]和泥鳅^[12] β -actin 基因启动子区域的研究表明, 鱼类 β -actin 基因启动子至少包括 TATA 盒、CArG 和 CCAAT 盒 3 个转录调控区域, CArG 定位于 TATA 盒和 CCAAT 盒之间, 为 CArG 转录因子结合位点, 是 β -actin 基因正常转录所必须的。在鲤、草鱼和泥鳅 β -actin 基因内含子 1 中也有一个保守的 CArG 调控元件, 能够增强 β -actin 基因的转录活性。鲮 β -actin 基因启动子区域也包含 TATA 盒、CArG 和 CCAAT 盒 3 个转录调控区域, 具有典型的 β -actin 基因启动子特征; 并且在鲮 β -actin 基因内含子 1 中也含有 1 个典型的 CArG 调控元件, 推测其对于提高 β -actin 基因的转录具有重要作用。鲮 β -actin 基因启动子区域和内含子中这些典型的调控元件是鲮 β -actin 基因正常表达所必须的。总之, 本研究克隆的鲮 β -actin 基因启动子区域具有典型的启动子特征, 为构建转全鱼基因表达载体提供了一个重要的启动子元件。

参考文献:

- [1] 陈湘舜, 乐佩琦, 林人端. 鲤科的科下分类及其宗系发生关系[J]. 动物分类学报, 1984, 9(4): 424—440.
- [2] 叶星, 刘家照. 麦瑞加拉鲮与鲮的养殖效果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. 鲮鱼生长激素基因 cDNA 的克隆和序列分析[J]. 中国水产科学, 2003, 10(2): 97—101.
- [4] Zhang Dian-Chang, Huang Yan-Qin, Shao Yan-Qing, et al. Molecular cloning, recombinant expression, and growth-promoting effect of mud carp (*Cirrhinus molitorella*) insulin-like growth factor-1[J]. Gen Comp Endocrinol, 2006, 148(2): 203—212.
- [5] Olsson P E, Kling P, Erkel L J, et al. Structural and functional analysis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) metallothionein-A gene[J]. Eur J Biochem, 1995, 230: 344—349.
- [6] Muller F, Williams D W, Kobolak J, et al. Activator effect of coinjected enhancers on the muscle-specific expression of promoters in zebrafish embryos[J]. Mol Reprod Dev, 1997, 47: 404—412.
- [7] Du S J, Gong Z, Hew C L, et al. Development of an all-fish gene cassette for gene transfer in aquaculture[J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1992, 1: 290—300.
- [8] Liu Z J, Zhu Z Y, Roberg K, et al. Isolation and characterization of beta-actin gene of carp (*Cyprinus carpio*) [J]. DNA Seq, 1990, 1: 125—136.
- [9] Liu Z J, Moav B, Faras A J, et al. Functional analysis of elements affecting expression of the β -actin gene of carp[J]. Mol Cell Biol, 1990, 10: 3 432—3 440.
- [10] 冯浩, 成嘉, 骆剑, 等. 青鱼 β -actin 基因克隆及其启动子功能的初步检测[J]. 遗传学报. 2006, 33(2): 133—140.
- [11] Hwang G L, Rahman M A, Razak S A, et al. Isolation and characterization of tilapia β -actin promoter and comparison of its activity with carp β -actin promoter[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, 1625: 11—18.
- [12] Noh J K, Cho K N, Han E H, et al. Genomic cloning of mud loach *Misgurnus mizolepis* (Cypriniformes, Cobitidae) β -actin gene and usefulness of its promoter region for fish transgenesis[J]. Mar Biotechnol, 2003, 5: 244—252.
- [13] 张殿昌, 江世贵, 邵艳卿, 等. 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[J]. 中国水产科学, 2006, 13(5): 708—712.
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [15] Itabajara da S V J, Saiki 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.
- [16] Arveiler B, Porteous D J. Amplification of end fragments of YAC recombinants by inverse polymerase chain reaction[J]. Technique, 1991, 3: 24—28.
- [17] Kilstrup M, Kristiansen K N. Rapid genome walking: A simplified oligo-cassette mediated polymerase chain reaction using a single genome-specific primer[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28: e55.
- [18] Parker J D, Rabinovitch P S, Burner G C. Targeted gene walking polymerase chain reaction[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19: 3 056—3 060.

Analysis of genomic structure and promoter characterization of mud carp (*Cirrhinus molitorella*) β -actin gene

ZHANG Dian-chang, SHAO Yan-qing, SU Tian-feng, JIANG Shi-gui

(Aquaculture and Biotechnology Division, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Mud carp (*Cirrhinus molitorella*) is one of the most commercially important freshwater fish in South China due to its consumer preference. Mud carp is suited to being processed in a variety of tinned foods and fish balls. Mud carp also has been popular in many other countries, such as Thailand and the Philippines. However, a slow growth and low cold-resistance of fingerlings have been the major problems encountered by aquaculture of mud carp. A slow growth has been suspected to be the direct consequences of limitation in somatic growth of juvenile fish. In order to increase growth ratio and improve quality of mud carp, it is necessary to cultivate a new breed of mud carp. As the part of cultivating a new breed of high growth ratio mud carp using transgenic techniques, in present study, the genomic DNA and promoter sequences of mud carp β -actin gene were amplified using PCR and Genome Walking methods. First, a pair of primers was designed on the basis of the cloned β -actin cDNA sequence of mud carp, and a DNA fragment of about 3.0 kb was amplified and sequenced using PCR method with the above primers, then, the primers were designed on the basis of the cloned DNA sequence, and the promoter DNA fragment of β -actin was amplified using the anchored PCR technique, finally, the two DNA sequences were edited and spliced. Mud carp β -actin gene consists of 4 351 bp and includes six exons and five introns, which is the same as those in other vertebrates. The promoter region within 1 173 bp contains consensus sequences for a TATA box, a CCAAT box, two CArG motifs and a CRE. Moreover, intron 1 also contains a typical CArG motif, which can enhance transcription of β -actin gene. The analysis of promoter of mud carp's β -actin gene is the basis of constructing expression vector of transgenic mud carp. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 345—351]

Key words: *Cirrhinus molitorella*; β -actin; promoter; sequence characterization; transgenic fish

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