

合浦珠母贝 -肌动蛋白基因的克隆和序列分析

凌立^{1,2}, 谢莉萍¹, 张勇¹, 蒲训², 张荣庆¹

(1. 清华大学 生物科学与技术系, 海洋生物技术研究所, 北京 100084; 2. 兰州大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要:为进一步研究珍珠质基质蛋白外排机制,同时为今后合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)不同组织的基因表达研究提供阳性对照,根据大鼠(*Rattus norvegicus*)胞质型肌动蛋白-actin设计引物,通过RT-PCR方法克隆鉴定了合浦珠母贝肌动蛋白同源基因片段。序列分析表明,该片段编码的氨基酸序列与相应同源片段具有较高的保守性。合浦珠母贝-肌动蛋白有多个特有的氨基酸残基。合浦珠母贝可能是在系统进化上较早分出的一支。

关键词:合浦珠母贝(*Pinctada fucata*); -肌动蛋白; 序列分析; 进化

中图分类号: Q81 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2006)08-0064-07

合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)属于软体动物门(Mollusca),瓣鳃纲(Lamellibranchia),异柱目(Anisomyaria),珠贝科(Pteriidae),分布于日本和我国南海,是我国用于生产海水珍珠最主要的贝类,具有较高的经济价值。

珍珠是由珍珠贝分泌的珍珠质包裹、沉积、覆盖而成的。珍珠质是产珠贝的贝壳内面和珍珠外表面带有明显光泽的矿物质,其主要成分是珍珠贝外套膜上皮细胞分泌的少量有机大分子和文石晶体形态的碳酸钙,晶体排列极其规则和精细致密,是典型的生物矿化产物^[1]。珍珠质具有良好的生物相容性与成骨活性,在医用生物材料领域具有广阔的应用前景。它是由外套膜上皮细胞分泌的基质蛋白不断掺入碳酸钙晶体形成的。细胞亚显微结构研究表明,产珠贝外套膜上皮细胞的内吞与外排作用非常活跃^[2]。

肌动蛋白家族普遍存在于真核生物中,在系统进化中具有较高的保守性^[3]。脊椎动物中,已鉴定出4种肌肉型肌动蛋白和2种胞质型肌动蛋白,其中这2种胞质型肌动蛋白在氨基酸序列、组织分布与功能方面具有显著差异。肌肉型肌动蛋白参与肌原纤维的构建^[4,5],而胞质型肌动蛋白是细胞骨架的重要组成部分,在细胞迁移、胞浆移动、染色体分离、细胞分裂与分化、细胞内吞和外排,信号转导等多方面发挥重要作用^[6~11]。-肌动蛋白属于非肌肉型肌动蛋白,其基因表达无肌细胞特异性,在淋巴细胞、成纤维细

胞、成骨细胞等组织细胞中都有稳定的高水平表达,故常被用作RT-PCR检测其它基因表达的阳性对照^[12]。

为进一步研究珍珠质基质蛋白外排机制,同时为今后合浦珠母贝不同组织的基因表达研究提供阳性对照,作者根据大鼠(*Rattus norvegicus*)胞质型肌动蛋白-actin设计引物^[13],通过RT-PCR方法克隆鉴定了合浦珠母贝肌动蛋白同源基因片段。序列分析表明,该片段编码的氨基酸序列与相应同源基因片段具有较高的保守性。然而,合浦珠母贝-肌动蛋白具有多个特有的氨基酸残基,它可能是在系统进化上较早分出的一支。

1 材料与方法

1.1 材料来源

合浦珠母贝取自广西壮族自治区北海市珍珠养殖场。迅速取下外套膜、消化腺、鳃、闭壳肌等组织,分别于RNA Alecter(Ambion, Inc.)中浸泡保存。

收稿日期:2003-10-20;修回日期:2004-03-10

基金项目:国家863计划资助项目(2001AA621140);国家自然科学基金资助项目(30170732)

作者简介:凌立(1979-),女,安徽省黄山市人,硕士研究生,研究方向:海洋生物学;张荣庆,通讯作者,电话:010-62772899, E-mail: rqzhang@mail.tsinghua.edu.cn

1.2 通过 RT-PCR 获得合浦珠母贝肌动蛋白基因片段

1.2.1 引物合成

根据肌动蛋白在系统进化中较为保守的特性,依据大鼠 α -actin 基因的 cDNA,在 Primer Premier 5.0 软件辅助下设计引物:

A1: 5'-GA GACCTTCAACACCCCA GC-3',

A2: 5'-GGACTCATCGTACTCCTGCTTG-3'。

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 模板 cDNA 的合成

利用总 RNA 提取试剂盒 RNagents[®] (Total RNA Isolation System (Promega)) 提取外套膜组织的总 RNA,以 1 μ g 总 RNA 为模板用逆转录 PCR 试剂盒 TaKaRa RNA PCR Kit (TaKaRa),参考试剂盒说明书进行逆转录反应,逆转录反应条件:42 $^{\circ}$ C,60 min;95 $^{\circ}$ C,5 min;4 $^{\circ}$ C,30 min。

1.2.3 PCR

采用 50 μ L 反应体系:10 mmol/L Tris-HCl (pH8.3)缓冲液,50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl₂,200 μ mol/L dNTP,上下游引物各 0.5 μ mol/L,2U TaKaRa DNA 聚合酶,cDNA 模板和灭菌双蒸水。利用 Tgradient Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) 进行 PCR 反应:94 $^{\circ}$ C 充分变性 2 min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min,产物于 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 PCR 产物纯化与克隆

取 15 μ L PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,切下与预期扩增大小一致的片段(723 bp),用 PCR 产物纯化试剂盒 Wizard[®] PCR Prep DNA Purification System (Promega) 纯化。纯化后的基因片段连接至 pGEM[®]-T Easy Vector (Promega)。转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5⁻,经蓝白斑筛选获得阳性重组子,测序鉴定。测序反应由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.3 序列分析

根据测序结果推测该基因片段编码的氨基酸序列。利用 FASTA 程序对 Swiss-Prot 等蛋白质库进

行同源蛋白比对。同源性比较及系统进化树的绘制利用分析软件 ClustalX^[14] 进行。

2 结果

2.1 通过 RT-PCR 获得合浦珠母贝肌动蛋白基因片段

以外套膜 cDNA 为模板,利用引物 A1 与 A2 进行 PCR 反应,获得 718 bp 的扩增产物(图 1)。PCR 产物纯化后经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,获得单一条带(图 1)。

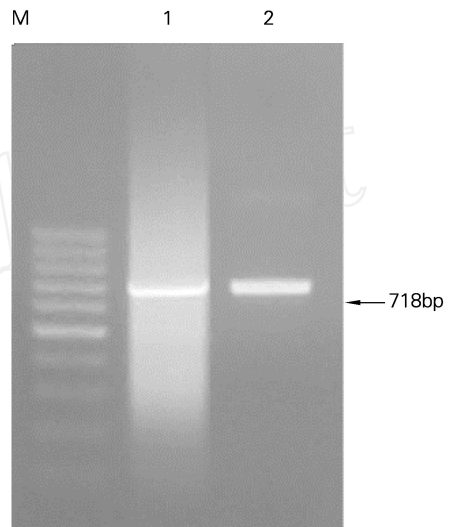


图 1 合浦珠母贝 α -肌动蛋白基因片段的扩增及纯化

Fig. 1 Amplification and purification of α -actin gene fragment from *P. fucata*

1: PCR 产物; 2: PCR 产物纯化结果; M: 100 bp DNA ladder。

Lane 1: Product of PCR; 2: Purified product of PCR; M: 100bp DNA ladder

纯化后的基因片段连接至 pGEM[®]-T Easy Vector (Promega) 转化大肠杆菌 DH5⁻,经蓝白斑筛选获得阳性重组子,提取质粒并进行酶切、测序鉴定。根据测序结果推测出该基因片段编码的氨基酸序列(图 2)。将克隆鉴定的肌动蛋白序列在 GenBank 登录,登录号为 AF378128。

CAACACCCAGCCTTTTATGTAGCCATCCAAGCTGTTCTGTCT	43
N T P A F Y V A I Q A V L S	14
TTGTATGCTCCGGTAGGACCACAGGGATCGTGTGGATTCCGGG	88
L Y A S G R T T G I V L D S G	29
GATGGGTCACTCACACCGTGCCTATCTACGAAGGATACGCCTTG	133
D G V T H T V P I Y E G Y A L	44
CCACACGCGATTCTGCGCATTGACCTAGCCGGAAGAGACATCACC	178
P H A I L R I D L A G R D I T	59
GACTACCTGATGAAAATCTTGACGGAGAGAGGATATTCCTTCACA	223
D Y L M K I L T E R G Y S F T	74
ACAACGCGGAAAAGAGAAATCGTACGAGATATAAAGGAGAAACTG	268
T T A E R E I V R D I K E K L	89
AGCTACGTCGCCGTTGATTTTCGATGCCGATATGGTTGCTGCCGCC	313
S Y V A V D F D A D M V A A A	104
CAAAGTTCAGCTCTAGAAAAGAACTACGAATTACCGGACGGCCAG	358
Q S S A L E K N Y E L P D G Q	119
GTTATAACAATTGGCAACGAAAGATTCCGCAGTGCAGAATCTTTG	403
V I T I G N E R F R S A E S L	134
TTTCAACCTCGTTCCTCGGAATGGAACAGGCTGGAATTCACGAA	448
F Q P S F L G M E Q A G I H E	149
TCAAATTACAATCTATTCTCAAATGCGATGTCGACATTCGAAAA	493
S T Y N S I L K C D V D I R K	164
GATTTACTCAAACGTCGTATTGTCTGGCGGTACAACGATGTTT	538
D L Y S N V V L S G G T T M F	179
CCGGGAATCGCCGATAGAATGAGCCCGAAATCGCTTCACTCGCG	583
P G I A D R M S P E I A S L A	194
CCTTCGCTTATCAANGGTAATAATCATTGCGCCACCTGAGAGGAAG	628
P S L I X G K I I A P P E R K	209
TACTCGGTGGATAGGTGGCAGTATTTGGCCTTCCTTTCTACC	673
Y S V W I G G S I L A F L S T	224
TTTCAGCAGATGTGGATCAAGCAAGCAGGAGTACGATGAGGTCCA	718
F Q Q M W I K Q A G V R	236

图 2 合浦珠母贝肌动蛋白基因片段核苷酸及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 The sequences of the cDNA fragment and deduced amino acid of
-actin from *P. fucata*

2.2 肌动蛋白同源性比较及系统进化分析

序列同源性分析表明,该片段编码的氨基酸序

列与其它动物的肌动蛋白氨基酸序列具有很高同源性(图 3)。

Pfu	N T P A F -- R I D L A G R D I ----- D A D M V A A A Q S S A L E K N Y E	114
Acc	-----M-----L-----L----- EQE - HT -- S -- A --- S--	240
Apc	-----M-----L-----L----- EQE - QT -- S -- S --- S--	242
Bpf	-----M-----L-----L----- EQE - HT -- T -- S --- S--	242
Cel	-----M-----L-----L----- EQE - AT -- S -- S --- S--	242
Lva	-----M-----L-----L----- EQE - TT -- S -- S --- S--	242
Mbr	-----M-----L-----L----- EQE - GT -- S -- S --- S--	241
Rno	-----M-----L-----L----- EQE - AT -- S -- S --- S--	241
Rma	-----M-----L-----L----- EQE - GT -- S -- S --- S--	241
Tru	-----M-----L-----L----- EQE - GT -- S -- S --- S--	241
Wba	-----M-----L-----L----- EQE - AT -- S -- S --- S--	242

Pfu	DADMVAAQAQSSALEKN SAESLFQPSFLGMEQAGIHES	152
Acc	EQE-HT--S--A---S--AP-A-----SA----T	278
Apc	EQE-HT--S--A---S--CP-AM-----SA-V--T	280
Bpf	EQE-HT--S--A---S--CP-AV-----SA----T	280
Cel	EQE-HT--S--A---S--CP-A-----SA----T	280
Lva	EQE-HT--S--A---S--CP-A-----SC----T	280
Mbr	EQE-HT--S--A---S--CP-A-----QT----A	279
Pfl	EQE-HT--S--A---S--CP-A-----SC----T	279
Rno	EQE-HT--S--A---S--CP-A-----SC----T	279
Rma	EQE-HT--S--A---S--CP-A-----SC----T	279
Tru	EQE-HT--S--A---S--CP-A-----SC----T	279
Wba	EQE-HT--S--A---S--CP-A-----ST----T	280
Pfu	-L--S--SP--ASLAPSLIXG--FL--WIKQAGVR--	236
Acc	-M--G--QK---TA-----TMKI--S-----SKEEYD--	362
Apc	-M--G--QK---TA-----TMKI--S-----SKEEYD--	364
Bpf	-M--G--QK---TA-----TMKI--S-----SKEEYD--	364
Cel	-M--G--QK---TA-----TMKI--S-----SKEEYD--	364
Lva	-M--G--QK---TA-----TMKI--S-----SKEEYD--	364
Mbr	-M--G--QK---TA-----TMKI--S-----SKEEYD--	363
Pfl	-M--G--QK---TA-----TMKI--S-----SKEEYD--	363
Rno	-M--G--QK---TA-----TMKI--S-----SKEEYD--	363
Rma	-M--G--QK---TA-----TMKI--S-----SKEEYD--	363
Tru	-M--G--QK---TA-----TMKI--S-----SKEEYD--	363
Wba	-M--G--QK---TA-----TMKI--S-----SKEEYD--	364

图3 合浦珠母贝-肌动蛋白氨基酸序列与同源序列的比较

Fig. 3 Comparison between the amino acid sequences of α -actins of *P. fucata* and other species

合浦珠母贝特异的氨基酸残基用阴影表示;Pfu:合浦珠母贝(*P. fucata*), AF378128;Acc:卡氏棘阿米巴(*Acanthamoeba castellanii*), 1002250A;Apc:海蜗牛(*Aplysia californica*), S43509;Bpf:双脐螺(*Biomphalaria pfeifferi*), AA K68712; Cel:线虫(*Caenorhabditis elegans*), S16709; Lva:南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*), AA G16253; Mbr:立襟鞭毛虫(*Monosiga brevicollis*), AA K27412; Pfl:川鲽(*Platichthys flesus*), AAF63665; Rno:大鼠(*Rattus norvegicus*), NM_031144; Rma:鲉鱼(*Rivulus marmoratus*), AAF26678; Tru:红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*), P53484; Wba:本氏丝虫(*Wuchereria bancrofti*), AAF25819.

The special amino acid residues of *P. fucata* are shaded; Pfu: *P. fucata*, AF378128; Acc: *Acanthamoeba castellanii*, 1002250A; Apc: *Aplysia californica*, S43509; Bpf: *Biomphalaria pfeifferi*, AA K68712; Cel: *Caenorhabditis elegans*, S16709; Lva: *Litopenaeus vannamei*, AA G16253; Mbr: *Monosiga brevicollis*, AA K27412; Pfl: *Platichthys flesus*, AAF63665; Rno: *Rattus norvegicus*, NM_031144; Rma: *Rivulus marmoratus*, AAF26678; Tru: *Takifugu rubripes*, P53484; Wba: *Wuchereria bancrofti*, AAF25819.

进一步分析发现合浦珠母贝肌动蛋白氨基酸序列与其它同源序列存在一定差异。具体表现在, Ser150, Leu156, Ser168, Ser187, Pro188, Ala191, Ser192, Leu197, Ile198, X199, Gly200, Phe221, Phe5, Ile51, Ile58, Asp97, Ala98, Asp99, Ala102, Lys230, Gln231, Ala232, Gly233, Val234, Arg235 等 Gln105, Asn112, Ser130, Ala31, Ser33, Gln144, 31个氨基酸残基具有特异性。

系统分析也证明合浦珠母贝肌动蛋白在系统发生上与其它动物的同源蛋白相距较远。从利用 ClustalX 的 Neighbor Joining (NJ) 运算方法在同源性基础上绘制的生物进化树可以看出(图 4),合浦珠母贝肌动蛋白与其他软体动物有较大的差异,因此它可能是在进化上较早分出的一支。

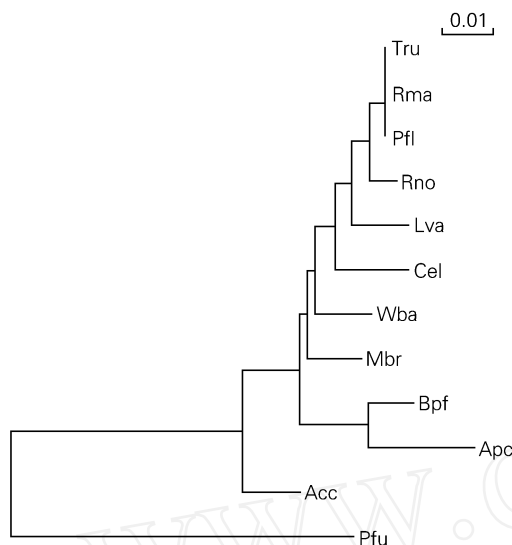


图 4 α -肌动蛋白系统进化树

Fig. 4 The phylogenetic tree of α -actin

图中简写同图 3

The abbreviation is the same as Fig. 3

3 讨论

珍珠除可作为装饰品外,还是一种名贵的药材。外部有明显光泽的珍珠质是由珍珠贝外套膜分泌的有机大分子 (< 5%) 和 CaCO_3 (> 95%) 的文石晶体组成,其机械强度比天然的 CaCO_3 结晶产物高 3 000 多倍^[15]。其中含量小于 5% 的基质蛋白决定碳酸钙晶体的形态与取向^[1]。但是它形成的分子机理一直未知,调节其生成的速度、品质更无从谈起。根据目前相关研究可知,珍珠质形成过程大致如下:(1) 基质蛋白经转录后修饰作用发生硫酸盐化、磷酸盐化和糖基化后,外套膜分泌基质蛋白进入外套腔中;(2) 有机大分子自组装,不溶性基质蛋白通过碱性结构域或二硫键等发生相互作用,或通过锚定蛋白交联,形成蛋白支架;(3) 在可溶性基质蛋白引导下,碳酸钙在蛋白支架上有序结晶。外套膜不仅分泌基质

蛋白直接参与珍珠的形成,还通过复杂的胞内机制对珍珠质的矿化周期进行调控^[16~19]。因此,外套膜细胞内蛋白的合成、修饰与代谢活动十分活跃。了解调控机理不仅可以为提高珍珠的产量和质量提供理论依据,也可为新型材料的研制开发提供新的思路。

近来研究发现,Rho 家族蛋白(一种小分子 G 蛋白)的下游靶因子之一——Bni1P Bud neck involved 1 在微丝细胞骨架蛋白组装过程中发挥重要作用,因此肌动蛋白可能与 G 蛋白信号转导通路有关^[20]。Stanton 等^[21]研究发现,哺乳动物 G 蛋白变异会导致成骨细胞异常分化和破骨细胞活性增强,G 蛋白信号通路可能参与生物矿化过程的调控。这进一步说明研究 α -肌动蛋白对揭开珍珠形成机理及各种基质蛋白和信号因子的有序分泌意义重大。

作者通过分子生物学的基本手段,得到合浦珠母贝 α -肌动蛋白基因全长的 70%,长度为 718。为进一步研究珍珠基质蛋白的外排机制奠定了基础,今后的研究应集中于合浦珠母贝肌动蛋白全长基因序列的克隆鉴定及其在不同组织中的表达分析。脊椎动物肌肉型肌动蛋白主要反映其自身的分化过程,而胞质型肌动蛋白相对稳定,在其进化树上可以清楚地看到演变过程^[22]。同源基因片段比较分析表明,合浦珠母贝在进化上具有独特的位置。

参考文献:

- [1] Addadi L, Weiner S. A pavement of pearl[J]. *Nature*, 1997, 389:912-915.
- [2] Marigomez I, Soto M, Cajaraville M P, *et al.* Cellular and subcellular distribution of metals in mollusc[J]. *Microsc Res Tech*, 2002, 56: 358-392.
- [3] Hightower R C, Meagher R B. The molecular evolution of actin [J]. *Genetics*, 1986, 114:315-332.
- [4] Korn E D. Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75:588-599.
- [5] Vandekerckhove J, Bugaisky G, Buckingham M. Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. A quantitative determination of the two actin isoforms [J]. *J Biol Chem*, 1986, 261:1 838-1 843.

- [6] Schroeder T E. Actin in dividing cells: Evidence for its role in cleavage but not mitosis. "Cell Motility" [J]. **Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation**, 1976, 3:265-277.
- [7] Mollenhauer H, Morre D. Cytochalasin but not colchicine inhibits migration of secretory vesicles in root tips of maize [J]. **Protoplasma**, 1976, 87:39-48.
- [8] Brawley S, Quatrano R S. Sulfation of fucoidan in *Fucus* embryos[J]. **Dev Biol**, 1979, 73:193-205.
- [9] Pollard T, Selden C, Maupin P. Interaction of actin filaments with microtubules [J]. **J Cell Biol**, 1984, 99:335-375.
- [10] Pollard T D, Wehling R. Cytoplasmic actin and myosin and cell movement [J]. **Crit Rev Biochem**, 1974, 2:1-65.
- [11] 朱建国, 林矫矫, 冯新港, 等. 日本血吸虫中国大陆株肌动蛋白编码基因的克隆和表达[J]. **生物化学与生物物理学报**, 2000, 32:545-549.
- [12] 戴旭明, 胡以平, 王肖鹏, 等. 直接 RT-PCR 技术扩增人 α -肌动蛋白和粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子 cDNA 片段[J]. **第二军医大学学报**, 1996, 17:181-184.
- [13] Nudel U, Zakut R, Shani M, *et al.* The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene [J]. **Nucleic Acids Res**, 1983, 11:1 759-1 771.
- [14] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The Clustalx windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. **Nucleic Acids Res**, 1997, 24:4 876-4 882.
- [15] Smith B L, Schaffer T E, Viani M, *et al.* Molecular mechanistic origin of the toughness of natural adhesives, fibres and composites[J]. **Nature**, 1999, 399: 761-763.
- [16] Sudo S, Fujikawa T, Nagakura T, *et al.* Structures of mollusc shell framework proteins [J]. **Nature**, 1997, **387** (6 633):563-564.
- [17] Kono M, Hayashi N, Samata T. Molecular mechanism of the Nacreous Layer formation in *Pinctada maxima* [J]. **Biochem Biophys Res, Comol/Lun**, 2000, **269** (1): 213-218.
- [18] Mann S. Molecular recognition in biomineralization [J]. **Nature**, 1988, 332: 119-124.
- [19] Zaremba C M, Belcher A M, Fritz M, *et al.* Critical transition in the biofabrication of Abalone shells and Flat pearls[J]. **Chem Mater**, 1996, 8: 679-690.
- [20] George M, Mark B, Sayonm A, *et al.* Circulating human dendritic cells differentially express high levels of A 55kd actin bundling protein [J]. **Am J Pathol**, 1996, **148** (2):593-600.
- [21] Stanton R P, Hobson G M, Montgomery B E, *et al.* Glucocorticoids decrease interleukin-6 levels and induce mineralization of cultured osteogenic cells from children with fibrous dysplasia [J]. **J Bone Miner Res**, 1999, **14** (7):1 104-1 114.
- [22] 胡松年, 阎隆飞. 肌动蛋白与真核生物的进化[J]. **动物学报**, 1999, **45** (4):440-447.

Cloning and analysis of the gene fragment of β -actin from *Pinctada fucata*

LING Li^{1,2}, XIE Li-ping¹, ZHANG Yong¹, PU Xun², ZHANG Rong-qing¹

(1. Department of Biological Sciences and Biotechnology, Institute of Marine Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. College of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Received: Oct. 20, 2003

Key word: *Pinctada fucata*; β -actin; sequence analysis; evolution

Abstract: Nacre is the internal lustrous “mother of pearl” layer, and pearls are composed entirely of nacre. Nacre is formed by the outer epithelia of the mantle, incorporating secret matrix proteins with calcium carbonate. So the endocytosis and exocytosis of the outer epithelia are very reactive. β -actin is an important component of cytoskeleton, which involved in a variety of cellular events including endocytosis and exocytosis. It is very important to elucidate the nacreous protein's exocytosis mechanism. The identification of β -actin in *Pinctada fucata* may also supply the positive comparison for gene expression in different tissues. In this paper we identified a fragment of β -actin gene by RT-PCR from *P. fucata*. Analysis shows a very high degree of homology between β -actin of *P. fucata* and β -actin from other animals. However the β -actin from *P. fucata* has several special characters in its amino acids and system evolution.

(本文编辑:张培新)