

# 大黄鱼 $\beta$ -actin 抗体的制备与组织表达谱分析

董 乐, 姚丽梅, 戴聪杰, 张 乐, 黄莘莘, 王建颖

(泉州师范学院 化学与生命科学学院, 近海资源生物技术福建省高校重点实验室, 福建 泉州 362000)

**摘要:** 为探讨大黄鱼(*Larimichthys crocea*) $\beta$ -actin 基因(*LcActb*)作为内参基因进行相关研究的可行性, 从转录和翻译水平研究其组织表达谱, 作者以大黄鱼肝脏为材料, 扩增 *LcActb* 的开放阅读框序列, 并将其亚克隆至原核表达载体 pET32a(+). 酶切、测序结果表明, pET32a-*LcActb* 构建成功. 将 pET32a-*LcActb* 转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行优化表达, 表达蛋白经纯化后进行 Western blotting 验证; 原核表达结果表明, IPTG 可诱导一个分子量约 45 ku 的特异蛋白, 且主要以包涵体的形式存在, 优化表达条件为: 28℃、0.4mmol/L IPTG、200 r/min 诱导表达 5 h. 用表达蛋白作为抗原, 免疫新西兰白兔制备抗 *LcActb* 的多克隆抗体; 用纯化的多抗进行 Western blotting 的结果表明, 获得了特异性的 *LcActb* 抗体; 通过实时荧光定量 RT-PCR 检测大黄鱼多种组织 mRNA 的表达, 其次, 制备了多种组织匀浆蛋白, 使用纯化的抗体进行 Western blotting 分析, 结果显示, *LcActb* 在大黄鱼成体各组织中转录和翻译水平的表达差异均不显著, 可做为研究大黄鱼成体组织中其他基因表达和翻译水平的内参标准.

**关键词:** 大黄鱼(*Larimichthys crocea*);  $\beta$ -肌动蛋白; 原核表达; 抗体; 组织表达谱

中图分类号: X55 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)12-0022-07

doi: 10.11759/hyxx20140223003

肌动蛋白(Actin)是构成细胞骨架的主要成分<sup>[1]</sup>, 几乎参与了真核细胞的所有生理过程, 如细胞分裂、染色体运动、细胞器运动、细胞激化、胞质流动、基因转录调控、mRNA 加工和运输等<sup>[2-4]</sup>. 肌动蛋白有 6 种异构体, 根据等电点的不同分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  3 类: 两个横纹肌( $\alpha$ -骨骼肌型,  $\alpha$ -心肌型), 两个平滑肌( $\alpha$ -血管平滑肌型,  $\gamma$ -内脏平滑肌型), 两个细胞质型( $\beta$ 和  $\gamma$  亚型)<sup>[5]</sup>. 其中,  $\beta$ -actin 除具氨基酸序列高度保守性外, 还能在不同的组织中持续衡量的表达, 且其表达量高, 因此在研究某个基因 mRNA 及蛋白质的相对表达量时, 常分别采用  $\beta$ -actin 基因的 mRNA 和  $\beta$ -actin 作为内标<sup>[6-9]</sup>. 但近年来也有研究表明,  $\beta$ -actin 基因有时也会受到生理状态或者环境的调控而出现表达水平的差异<sup>[10-12]</sup>. 因此, 在采用  $\beta$ -actin 及其基因作为分子内标开展实验研究时, 必须首先评价其在该物种中的表达特征.

迄今, 鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、真鲷(*Pagrosomus major*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、鳊(*Elopichthys bambusa*)、尖头鲈(*Phoxinus oxycephalus* Sauvage et Dabry)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、斜带石斑鱼(*Epinephelus joides*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)、松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)等硬骨鱼类的  $\beta$ -actin 基因已被克隆<sup>[13-14]</sup>. 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)系鲈形目(Perciformes)、石首鱼科(Sciaenidae)、黄鱼属(*Pseudosciaena*), 是中国海洋主要经济鱼类之一<sup>[15]</sup>. 对大黄鱼功能基因的挖掘与利用的研究极为重要. 大黄鱼  $\beta$ -actin 基因(*LcActb*)全长 cDNA 序列已被提交 GenBank(GU 584189.1; FJ936563.1), 但其在转录和翻译水平上组织表达谱的研究尚未见报道.

本研究采用 RT-PCR 技术克隆 *LcActb* 的开放阅读框(Open reading frame, ORF), 同时, 将其亚克隆到原核表达载体上进行表达, 并制备和纯化抗 *LcActb* 的多克隆抗体, 通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和 Western blotting 方法, 分析 *LcActb* 在肌肉、心脏、肝脏等 8 个组织中的表达模式, 为探讨其作

收稿日期: 2014-02-23; 修回日期: 2014-09-22  
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31272679); 福建省高校服务海西建设重点项目(A101); 福建省生物学省级重点学科建设项目(zdxx); 泉州市科技计划重点项目(2013Z126)

作者简介: 董乐(1966-), 男, 河北丰南人, 副教授, 硕士, 主要从事海洋生物分子生物学研究, 电话: 0595-22919557, E-mail: dwf320@163.com; 戴聪杰, 通信作者, 电话: 0595-22919557, E-mail: congjied-ai501@163.com

为内参基因进行相关研究的可行性,也为进一步研究大黄鱼功能基因的差异表达提供基础数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

成熟大黄鱼 (全长 410~450 mm)活体购于福建省宁德市海洋技术开发有限公司,解剖后,取其心脏、肝、脾、肠、胃、肾、肌肉和幽门垂共 8 种组织,立即冻存于液氮中,带回实验室后转入-80℃冰箱保存备用。雌、雄鱼各取 5 尾,用于提取克隆 *LcActb* 的 ORF 序列和分析 *LcActb* 组织表达所需的总 RNA。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PCR 扩增 *LcActb* 的 ORF 序列

以常规 Trizol 法提取各组织的总 RNA 后,按 Invitrogen 公司的试剂盒说明书进行 mRNA 的纯化和 cDNA 第一链的合成。以合成的肝脏 cDNA 第一链为模板,根据已克隆的 *LcActb* 全长 cDNA 序列 (GenBank accession: GU584189.1; FJ936563.1)设计 1 对特异性引物,以此进行 PCR 扩增得到 *LcActb* 的 ORF 序列,引物序列如下:

P1: 5'- CCCAAGCTT(*Hind* III 识别位点)ATGG AAGATGAAATCGCCGC;

P2: 5'- CCGCTCGAG(*Xho* I 识别位点)TTAGAA GCATTGCGTTTTCGGTGGAC,

引物由上海生工生物技术工程服务有限公司合成。

PCR 反应体系为 50  $\mu$ L,其中包括 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.3)、50 mmol/L KCl、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、1 mmol/L dNTPs、10<sup>-4</sup> mmol/L P1、10<sup>-4</sup> mmol/L P2、1 unit Taq DNA polymerase。反应条件为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 50℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 循环数 35 个; 72℃ 再延伸 10 min。

#### 1.2.2 *LcActb* 原核表达载体的构建

按文献[16]进行; DNA 测序由上海生工生物技术工程服务有限公司进行; *LcActb* 的 ORF 序列分析用 DNA Strider 1.2。

#### 1.2.3 pET32a-*LcActb* 在大肠杆菌中的表达及可溶性分析

重组质粒转化 *E. coli* BL21, 挑取阳性单菌落,活化后进行诱导表达,同时设未诱导对照。其中, IPTG 分别设置为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.7、0.8 mmol/L,诱导温度分别设置为 18、24、28、34、37℃,诱导时间分别设置为 2、3、4、5、6、7 h。重组表达蛋白可溶性分析按文献[16]进行。用 SDS-PAGE 电泳检

测表达产物,分离胶浓度为 12%。

#### 1.2.4 *LcActb* 的纯化

重组菌按上述探索好的条件大量表达。*LcActb* 的纯化按 QIAGEN 公司 Ni-NIA Agarose 试剂盒说明书进行,并用 SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度。

#### 1.2.5 *LcActb* 抗血清的制备及效价检测

按文献[17]进行。

#### 1.2.6 *LcActb* 抗血清 IgG 的纯化

按文献[18]进行。

#### 1.2.7 Western Blotting 分析

按文献[16]进行。其中,鼠抗 His 单克隆抗体作为一抗(1: 3000),辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 为二抗(1: 4000),用 ECL 发光试剂盒曝光充分显色,拍片保存。

#### 1.2.8 *LcActb* 在大黄鱼各组织的表达

分别提取心脏、肝、脾、肠、胃、肾、肌肉和幽门垂共 8 种组织的 RNA 后,进行 qRT-PCR。引物序列如下,

qAct1: ACGCCAACACCGTGCTGTC;

qAct2: TTAGAAGCATTTCGGTGGAC,

引物由上海生工生物技术工程服务有限公司合成。

qRT-PCR 反应体系为 15  $\mu$ L: Mix 7.5  $\mu$ L, qAct1 0.15  $\mu$ L; qAct2 0.15  $\mu$ L; cDNA 1.5  $\mu$ L; RNase Free ddH<sub>2</sub>O 补至 15  $\mu$ L。

于 StepOnePlus™实时荧光定量 PCR 系统上扩增,程序为: 50℃, 2 min; 95℃, 10 min; 95℃, 15 s, 60℃, 1 min, 循环数 40 个。PCR 扩增产物先用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。*LcActb* mRNA 相对表达水平用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>法计算<sup>[19]</sup>。每个样品重复 3 次。以肝脏的表达水平作对照,目的基因相对表达量用平均值 $\pm$ 标准差表示,数据分析采用 SPSS17.0 统计分析软件, Duncan 法进行多重比较,当  $P < 0.05$  时差异显著。

#### 1.2.9 *LcActb* 在大黄鱼各组织的表达

从心脏、肝、脾、肠、胃、肾、肌肉和幽门垂共 8 种组织中提取总蛋白。采用 Bradford 方法<sup>[20]</sup>定量蛋白质后,每个组织取 1 mg 蛋白质进行 SDS-PAGE 分析,分离胶浓度为 12%。经 Western Blotting 检测 *LcActb* 在大黄鱼各组织中的表达情况。实验经 3 次生物学重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 pET32a-*LcActb* 的构建及鉴定

*LcActb* ORF 的 PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后,将预期大小的 PCR 产物与 pET32a(+)载体

用 T<sub>4</sub>DNA 连接酶连接。连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ，经选择性培养基筛选和双酶切鉴定，挑选阳性重组质粒进行测序。测序结果表明(图 1)，该片段长 1128 bp，

编码 375 个氨基酸残基组成的肽段。序列分析表明，该片段序列与原序列一致，阅读框架正确，目的基因插入正确，显示重组表达载体 pET32a-*LcActb* 构建成功。

```

1   ATGGAAGATGAAATCGCCGCACTGGTTGTTGACAAACGGATCCGGTATGTGCAAAGCCGGATTC
1   M E D E I A A L V V D N G S G M C K A G F
64  GCCGGAGACGACGCCCCCTCGTGCTGTCTCCCATCCATCGTCCGTCGCCCCAGACATCAGGGT
22  A G D D A P R A V F P S I V G R P R H Q G
127 GTGATGGTTGGTATGGGCCAGAAGGACAGCTACGTTGGTGTGATGAAGCCCAGAGCAAGAGAGGT
43  V M V G M G Q K D S Y V G D E A Q S K R G
190 ATCCTGACCCTGAAGTACCCCATCGAGCACGGTATTGTGACCAACTGGGATGACATGGAGAAG
64  I L T L K Y P I E H G I V T N W D D M E K
253 ATCTGCATCACCTTCTACAACGAGCTCAGAGTTGCCCTGAGGAGCACCCCTGCTCTGCTC
85  I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V L L
316 ACAGAGGCCCCCTGAACCCCAAAGCCAACAGGGAGAAGATGACCCAGATCATGTTCCGAGACC
106 T E A P L N P K A N R E K M T Q I M F E T
379 TTCAACACCCCTGCCATGTACGTTGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTGTATGCCTCTGGTCGT
127 F N T P A M Y V A I Q A V L S L Y A S G R
442 ACCACTGGTATCGTCATGGACTCCGGTGTGTTGTTGACCCACACAGTGCCCATCTACGAGGGT
148 T T G I V M D S G D G V T H T V P I Y E G
505 TATGCCCTGCCCATGCCATCCTGCGTCTGGACTTGGCCGGCCGCGACCTCACAGACTACCTC
169 Y A L P H A I L R L D L A G R D L T D Y L
568 ATGAAGATCCTGACAGAGCGGTTACTCCTTCAACCACAGCCGAGAGGGAAATCGTGCGT
190 M K I L T E R G Y S F T T T A E R E I V R
631 GACATCAAGGAGAAGCTGTGCTATGTCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGGCACTGCTGCC
211 D I K E K L C Y V A L D F E Q E M G T A A
694 TCCTCCTCCTCCCTGGAGAAGAGCTATGAGCTGCCCGACGGACAGGTCATCACCATCGGCAAT
232 S S S S L E K S Y E L P D G Q V I T I G N
757 GAGAGGTTCCGTTGCCAGAGGCCCTCTCCAGCCTTCCCTCCTCGGTATGGAATCTTGCGGA
253 E R F R C P E A L F Q P S F L G M E S C G
820 ATCCACGAGACCACCTACAACAGCATCATGAAGTGGCAGCTCGACATCCGTAAGGACCTGTAC
274 I H E T T Y N S I M K C D V D I R K D L Y
883 GCCAACACCGTGTGTCTGGAGGTACCACCATGTACCCCGGCATCGCCGACAGGATGCGAAG
295 A N T V L S G G T T M Y P G I A D R M Q K
946 GAGATCACAGCCCTGGCCCCATCCCATGAAGATCAAGATCATTGCCCCACCTGAGCGTAA
316 E I T A L A P S T M K I K I I A P P E R K
1009 TACTCTGTCTGATCGGAGGCTCCATCCTGCGCTCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATC
337 Y S V W I G G S I L A S L S T F Q Q M W I
1072 AGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAA
358 S K Q E Y D E S G P S I V H R K C F *
    
```

图 1 *LcActb* 的 ORF 序列和推断的氨基酸序列

Fig.1 The cDNA and predict amino acid sequences of the *LcActb* ORF in *L. crocea*

## 2.2 *LcActb* 蛋白原核表达、可溶性分析及纯化

pET32a-*LcActb* 重组菌经菌落 PCR 检测后，随机挑取 1 个阳性菌，加 IPTG 诱导表达。pET32a-*LcActb* 诱导表达量随温度升高而增多，至 28 °C 时，其表达量达最高后，又随温度升高而减少。故选择诱导温度为 28 °C，结果见图 2A。由于目的蛋白为 41.701 ku，加上质粒 pET-32a(+) 在多克隆位点上游有一段编码序列，融合蛋白约为 45~47 ku。实验结果与预期的目的蛋白大小相符。不同时间诱导时，诱导 5 h 后诱导表达量增多，故选择诱导时间为 5 h，结果见图 2B；不同 IPTG 浓度诱导时，IPTG 浓度从 0.1 mmol/L 到 0.8 mmol/L 诱导时，表达量最大时的 IPTG 浓度为 0.4 mmol/L，结果见图 2C；用 IPTG 浓

度为 0.4 mmol/L 诱导表达的 BL21 重组菌经离心收集菌体，菌体经超声波裂解，用 SDS-PAGE 分析裂解后的上清和沉淀，pET32a-*LcActb* 表达蛋白存在菌体裂解液沉淀中，即以包涵体形式表达，结果见图 2D。

纯化的 *LcActb* 用 SDS-PAGE 进行分析，结果只含有一条目的蛋白带(图 3A)。蛋白浓度为 1.67 g/L。经 Western blotting 验证，泳道上出现蛋白特异性的反应条带(图 3B)。实验结果表明，*LcActb* 表达成功。

## 2.3 抗 *LcActb* 抗血清制备及其效价检测和特异性分析

以纯化 *LcActb* 为抗原制备抗血清。以未免疫的兔血清作为阴性对照，将免疫的兔抗血清做不同稀释后，进行 ELISA 检测。标本孔的吸收值与阴性标本孔的吸收值的比值(P/N)大于 2.1 时判断为阳性。

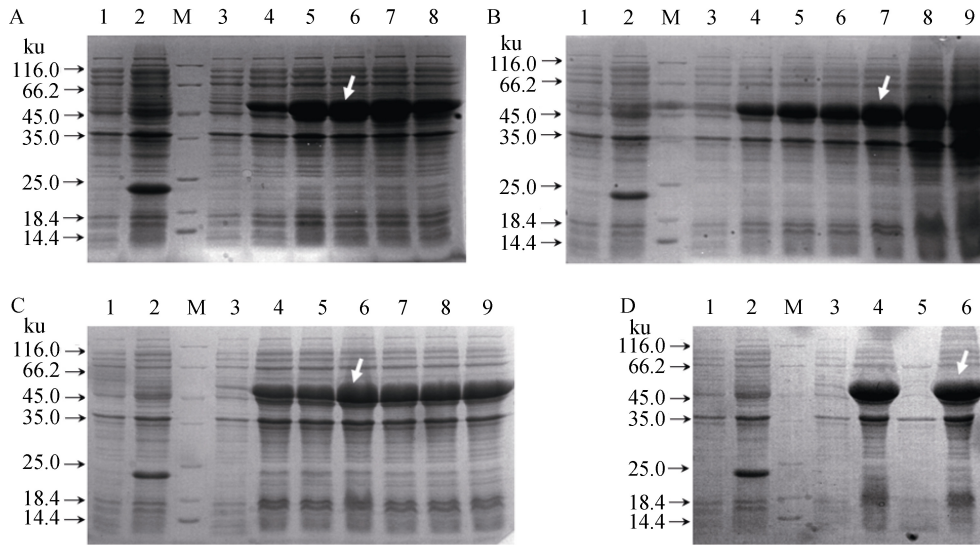


图 2 pET32a-*LcActb* 原核表达条件的优化及可溶性分析 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE analysis of optimized expression condition and the protein solubility of pET32a-*LcActb* in *E. coli*

A. 诱导温度对 *LcActb* 蛋白表达量影响的 SDS-PAGE 图谱, M. 蛋白分子量标准; 1. pET32a(+)未诱导; 2. pET32a(+)诱导; 3. pET32a-*LcActb* 未诱导;白色箭头所示为目的蛋白条带(下同), 4-8. pET32a-*LcActb* 分别在 18、24、28、34、37°C 时诱导表达产物; B. 诱导时间对 *LcActb* 蛋白表达量影响的 SDS-PAGE 图谱, 4-9. pET32a-*LcActb* 为分别在 2, 3, 4, 5, 6, 7 h 时诱导表达产物; C. IPTG 诱导浓度 *LcActb* 蛋白表达量影响的 SDS-PAGE 图谱, 4-8. pET32a-*LcActb* 为诱导分别在 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.7, 0.8 mmol/L 时表达产物; D. *LcActb* 蛋白可溶性分析的 SDS-PAGE 图谱, 3, 5. 菌体裂解上清液; 4, 6. 菌体裂解沉淀液

A. SDS-PAGE analysis of the influence of different induction temperature on the expression amount of *LcActb* in *E. coli*, M. Protein molecular weight standard, 1. pET32a(+) transformed bacterial cells before IPTG induction, 2. pET32a(+) transformed bacterial cells induced for 6 h by 1.2 mmol/L IPTG, 3. The recombinant plasmid pET32a-*LcActb* transformed bacterial cells before IPTG induction; White arrow shows the recombinant *LcActb*(the same as fig.2B, C, D), 4-8. The recombinant plasmid pET32a-*LcActb* transformed bacterial cells induced respectively in 18, 24, 28, 34, 37°C for 6 h by 1.2 mmol/L IPTG; B. SDS-PAGE analysis of the influence of different induction time on the expression amount of *LcActb* in *E. coli*, 4-9. The recombinant plasmid pET32a-*LcActb* transformed bacterial cells induced respectively for 2, 3, 4, 5, 6, 7 h by 1.2 mmol/L IPTG, at 28°C; C. SDS-PAGE analysis of the influence of different IPTG concentration on the expression amount of *LcActb* in *E. coli*, 4-8. The recombinant plasmid pET32a-*LcActb* transformed bacterial cells induced for 6 h in 28°C respectively by 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.7, 0.8 mmol/L IPTG; D. SDS-PAGE analysis of the *LcActb* protein solubility, 3. The supernatant of the recombinant plasmid pET32a-*LcActb* transformed bacterial cells induced by 28°C, 200 r/min, 5 h and 0.4 mmol/L IPTG, the precipitation of the recombinant plasmid pET32a-*LcActb* transformed bacterial cells induced by 28°C, 200 r/min, 5 h and 0.4 mmol/L IPTG

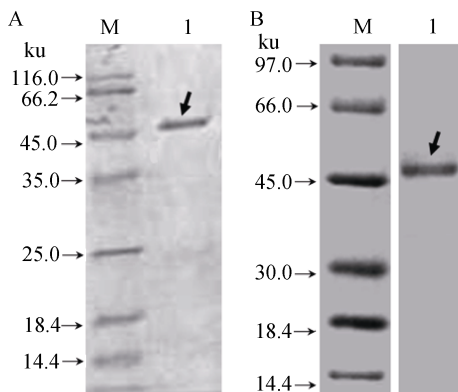


图 3 *LcActb* 蛋白纯化的 SDS-PAGE 图谱和 Western blotting 验证

Fig.3 SDS-PAGE and Western blotting analysis of purified *LcActb*

A. 纯化 *LcActb* 的 SDS-PAGE 图谱; B. 纯化 *LcActb* 的 Western blotting 验证; M. 蛋白分子量标准; 1. *LcActb* 纯化产物

A. SDS-PAGE analysis of purified *LcActb*; B. Western blotting analysis of purified *LcActb*; M. Protein molecular weight standard; 1. purified *LcActb*

结果表明, *LcActb* 的兔抗血清效价达到 1 : 1.00×10<sup>6</sup>。

Western blotting 结果显示, 用免疫前的血清进行实验时不显示条带; 未纯化的抗血清由于含有很多非特异性抗体, 所以有非特异性条带; 而用纯化的 *LcActb* 特异性的抗体(1: 1000 稀释), 则无非特异性条带(图 4)。以上结果表明, 制备和纯化后的 *LcActb* 多克隆抗体特异性较强。

## 2.4 *LcActb* 基因在大黄鱼各组织的表达

利用 qRT-PCR 方法分析 *LcActb* 在大黄鱼心脏、肝、脾、肠、胃、肾、肌肉和幽门垂共 8 种组织的表达及差异, 结果显示, *LcActb* 在这些组织中均有表达。

应用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算 *LcActb* 在各组织中的表达量, 以肝的表达量为 1 计算, *LcActb* 在各组织的表达量无显著性差异(图 5)。

利用 Western blotting 方法分析 *LcActb* 在大黄鱼上述 8 种组织的表达及差异, 结果显示(图 6), *LcActb* 在

这些组织中含量无显著差异。

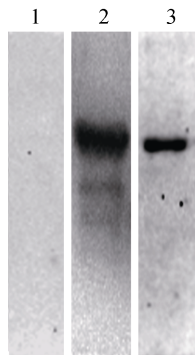


图 4 纯化的多克隆抗体的 Western blotting 特异性分析

Fig.4 Western blotting analysis of purified LcActb antibody

1. 免疫前血清; 2. 未纯化的抗血清; 3. 纯化的多克隆抗体  
1. Pre-immuserum; 2. No-purified LcActb antibody; 3. Purified LcActb antibody

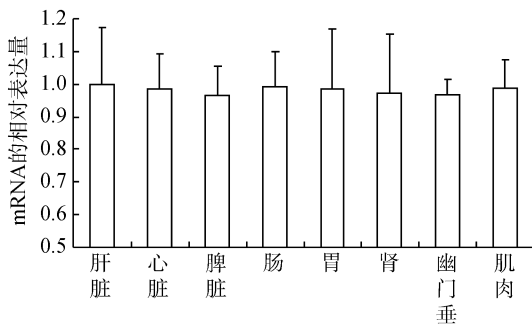


图 5 *LcActb* 在不同组织中的表达量

Fig.5 Expression pattern of *LcActb* in different tissues of *L. crocea*

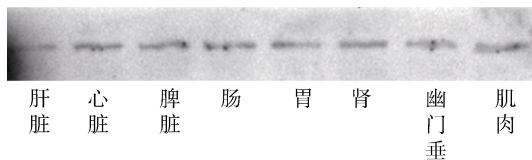


图 6 *LcActb* 在不同组织中的含量

Fig.6 Expression pattern of *LcActb* in different tissues of *L. crocea*

### 3 讨论

一直以来, 在分子生物学领域的基因 mRNA 的相对表达研究中, 由于  $\beta$ -actin 具有时空恒定表达的特性而成为最常用的内参基因。但近年来有研究认为,  $\beta$ -actin 在有些物种、某些情况下并不适合作为内参基因。其一,  $\beta$ -actin 表达水平在不同的外界环境或生理条件下可能存在显著的差异<sup>[20-21]</sup>, 如广温性鲤 (*Cyprinus carpio*) 冷适应机制的研究表明,  $\beta$ -actin 的表达水平在冬季和夏季存在显著性差异<sup>[22]</sup>。其二,

$\beta$ -actin 基因的表达水平在生物不同的生长阶段也有所不同<sup>[23]</sup>, 如斑马鱼  $\beta$ -actin 基因表达量在脑神经细胞增殖时过表达<sup>[24]</sup>。其三,  $\beta$ -actin 基因受某些疾病的影响表达量也有所不同, 如在哮喘患者气道中  $\beta$ -actin 基因的表达水平比正常组织中的表达水平低 10 倍<sup>[11]</sup>。这说明, 在利用  $\beta$ -actin 作为内参进行基因表达研究时, 首先要对其作为分子内参的可靠性进行评估。

本研究通过 qRT-PCR 检测得到的结果表明, 大黄鱼 *LcActb* 的 mRNA 在所采集的成体鱼心脏、肝、脾、肠、胃、肾、肌肉和幽门垂共 8 种组织中的表达差异均不显著。这与宽体沙鳅 (*Botia reevesae*)<sup>[13]</sup>、鳃 (*Elopichthys bambusa*)<sup>[14]</sup>、三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*)<sup>[25]</sup>、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)<sup>[26]</sup> 中的研究结果基本一致。但迄今, 关于鱼类  $\beta$ -actin 表达的研究都没有从不同的发育阶段及外界环境或生理条件对其影响等方面进行系统的展开, 基本上仅限于基因在某一时期不同组织中的表达差异方面进行分析。本研究只研究了成体鱼不同组织中 *LcActb* 的表达情况, 至于, *LcActb* 表达水平在不同的生长阶段、在不同的外界环境或生理条件下是否存在差异, 将是我们下一步要深入研究的问题。因此, *LcActb* 可作为研究大黄鱼成体鱼中其他基因表达转录水平时的内参标准。

mRNA 的相对量说明了  $\beta$ -actin 在转录水平上是否存在差异; 蛋白质的相对量能进一步表明  $\beta$ -actin 在转录后水平的差异。现有文献也基本上只针对于前一个方面开展研究。本研究进一步分析了 *LcActb* 在转录后的蛋白质水平的差异。Western blotting 检测的结果表明, *LcActb* 在转录后水平也无差异, 即 *LcActb* 在 8 种组织中表达量恒定。因此, *LcActb* 可作为研究大黄鱼成体鱼中其他基因表达转录后水平的内参标准。

#### 参考文献:

[1] Ma H M, Mai K S, LiuFu Z G. Cloning and characterization of an actin gene of *Chlamys farreri* and the phylogenetic analysis of mollusk actins[J]. Chin J Oceanol Limnol, 2007, 25(3): 304-309.  
[2] Pederson T. Half a century of "the nuclear matrix" [J]. MolBiol Cell, 2000, 11(3): 799-805.  
[3] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software

- version 4.0[J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [4] Wang Z L, Wu Z H, Jian J C, et al. Cloning and expression of an actin gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850) [J]. *Mar Genom*, 2008, 1(2): 63-67.
- [5] 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(4): 655-665.
- [6] Zhong H, Jonathan W S. Direct comparison of GAPDH,  $\beta$ -actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 259(3): 523-526.
- [7] 夏来新, 程汉华, 郭一清, 等. 黄鳍  $\beta$ -actin 的克隆及其在鱼类中的系统发生分析[J]. *遗传学报*, 2005, 32(7): 689-695.
- [8] Nicot N, Hausman J F, Hoffmann L, et al. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress[J]. *J Exp Bot*, 2005, 56(421): 2907-2914.
- [9] Isabel C, Francisco V S, Frederick S B, et al. Isolation of the Atlantic salmon  $\beta$ -actin promoter and its use to drive expression in salmon cells in culture and in transgenic zebrafish[J]. *Aquaculture*, 2010, 309(1-4): 75-81.
- [10] 段晶晶, 李霞, 周伯文, 等. 仿刺参  $\beta$ -actin 基因的克隆及在各组织中的表达[J]. *大连水产学院学报*, 2009, 24(2): 176-180.
- [11] Glare E M, Divjak M, Bailey M J, et al.  $\beta$ -actin and GAPDH house keeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels[J]. *Thorax*, 2002, 57(9): 765-770.
- [12] Ruan W J, Lai M D. Actin, a reliable marker of internal control[J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 385 (1-2): 1-5.
- [13] 覃川杰, 陈立侨, 岳兴建, 等. 宽体沙鳅 (*Botia reevesae*)  $\beta$ -肌动蛋白基因的 cDNA 克隆与表达分析[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(2): 396-402.
- [14] 郁建锋, 王蕾, 张燕萍, 等. 鳃  $\beta$ -肌动蛋白基因的克隆及表达分析[J]. *常熟理工学院学报(自然科学)*, 2011, 25(4): 65-70.
- [15] 张彩兰, 刘家富, 李雅瑾, 等. 福建省大黄鱼养殖现状分析与对策[J]. *上海水产大学学报*, 2002, 11(1): 77-83.
- [16] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂等, 译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1217-1232.
- [17] 杨琴, 曹军皓, 丁进亚, 等. 转位紧密黏附素受体细胞骨架偶联蛋白基因克隆、表达、抗体制备及应用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(12): 1282-1285.
- [18] Zhao Q G, Zhou Y, Zhu H Q, et al. Generation of mouse FANCL antibody and analysis of FANCL protein expression profile in mouse tissues[J]. *Acta Genetica Sin*, 2006, 33(1): 49-55.
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] Bradford M M. A rapid and sensitive method of or the quantitation of microgram quantitative of protein using the principle of protein - dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [21] 梁赞姜, 汲坤, 王立军. 大鼠不同脏器  $\beta$ -actin mRNA 稳定性差异的实验研究[J]. *锦州医学院学报*, 2006, 6(3): 11-13.
- [22] Sarmiento J, Leal S, Quezada C, et al. Environmental acclimatization of the carp modulates the transcription of  $\beta$ -actin [J]. *J Cell Biochem*, 2000, 80(2): 223-228.
- [23] Moshier J A, Cornell T, Majumdar A P. Expression of protease genes in the gastric mucosa during aging [J]. *Exp Gerontol*, 1993, 28(3): 249-258.
- [24] Alejandro B, Rogelio G S, María G I, et al. Differential brain expression of a new  $\beta$ -actin gene from zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Eur J Neurosci*, 1999, 11(1): 369-372.
- [25] 袁一鸣, 李家乐, 汪桂玲, 等. 三角帆蚌  $\beta$ -肌动蛋白基因的 cDNA 全长克隆及表达分析[J]. *水产学报*, 2010, 34(6): 871-879.
- [26] 宋伟, 王晓琳, 严维辉, 等. 黄颡鱼  $\beta$ -肌动蛋白基因的克隆及表达分析[J]. *江苏农业学报*, 2008, 24(3): 263-267.

## Expression and purification of $\beta$ -actin antibody from *Larimichthys crocea*

DONG Le , YAO Li-mei, DAI Cong-jie, ZHANG Le, HUANG Ping-ping, WANG Jian-ying  
(College of Chemistry and Life Science, the Higher Educational Key Laboratory for Offshore Resources and Biotechnology of Fujian Province, Quanzhou Normal University, Quanzhou Fujian 362000, China)

**Received:** Feb., 23, 2014

**Key words:** *Larimichthys crocea*; beta- actin; prokaryotic expression; antibody; tissues expression

**Abstract:** In order to evaluate the feasibility that the  $\beta$ -actin gene of Large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), named as *LcActb*, acts as internal reference gene for the relevant researches, the expression level of *LcActb* was analysed in different tissues. *LcActb* was isolated from the total RNA of livers from *L. crocea* by RT-PCR with gene specific primers designed according to the sequence of open reading frame of published data. Furthermore, a prokaryotic expression vector pET32a-*LcActb* was constructed and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). After induced by IPTG, a molecular mass of fusion protein close to 45 ku was produced, and the best expression was induced by 0.4 mmol/L IPTG at 28 °C, 200 r/min for 5 h. The fusion protein was purified and examined by SDS-PAGE and western blotting analysis. *LcActb* proteins were used to immunize adult rabbits following standard protocols. Consequently, it was found by using Western blotting analysis that polyclonal antibodies against *LcActb* had high specificity. The relative expression levels of *LcActb* mRNA in *L. crocea* were determined by fluorescent Real-time RT-PCR. *LcActb* was steadily expressed in different tissues of *L. crocea*. Meanwhile, the expression of *LcActb* protein was also analyzed using the purified antibodies through Western blotting. It was found that *LcActb* was steadily expressed in the detected tissues. So this *LcActb* gene was suitable as an internal control for analysis of functional gene in *L. crocea*.

(本文编辑: 谭雪静)