

鳊鱼(*Siniperca chuatsi*) β -肌动蛋白基因 cDNA 全序列与 5' 侧翼区的克隆与分析*

刘秀霞 梁旭方 王琳 端金霞 李光照 廖婉琴

(暨南大学生命科学技术学院 广州 510632)

提要 采用 RT-PCR 及 RACE 法, 分离、克隆鳊鱼 β -肌动蛋白基因 cDNA 全序列, 再用基因组步行法(Genome Walker)克隆鳊鱼 β -肌动蛋白基因 5' 调控区。序列分析结果表明, 鳊鱼 β -肌动蛋白基因全长 1897bp, 其中 5'-UTR 长 94bp, 3'-UTR 长 675bp, 编码区长 1128bp, 编码 375 个氨基酸。将所得序列与其它动物类群的 β -肌动蛋白基因序列进行比较分析显示, 鱼类、两栖类、鸟类、哺乳类等不同类群脊椎动物 β -肌动蛋白氨基酸序列同源性均在 96%以上, 说明该基因在生物进化过程中高度保守。通过鳊鱼与其它脊椎动物 β -肌动蛋白基因的核苷酸序列构建的进化树显示, 脊椎动物 β -肌动蛋白聚类成 3 个分支, 鱼类 β -肌动蛋白基因形成一个独立的分化群, 说明鱼类 β -肌动蛋白基因起源于一个共同祖先。克隆得到的鳊鱼 β -肌动蛋白基因 5'侧翼序列长 1399bp, 对其进行序列分析, 在其起始密码子 ATG 上游 200bp 范围内发现含有 CAAT box、CC(A/T)6GG(CArG box)、TATA box 对转录调控起重要作用的顺式元件, 同时在侧翼区也发现含有 GC box、MYOD、YY1、SP1、GATA 等多个潜在调控元件。鳊鱼 β -肌动蛋白基因 5'侧翼序列的克隆成功, 为今后转基因鳊鱼的研究工作奠定了基础。

关键词 β -肌动蛋白基因, cDNA 序列, 5' 调控区, 克隆, 鳊鱼

中图分类号 Q953

肌动蛋白是构成细胞骨架和肌小节的主要成分, 具有重要的生理功能, 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、胞质流动等(Sheterline *et al*, 1995; Welch *et al*, 1994)。肌动蛋白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 42kD 左右。脊椎动物肌动蛋白家族至少编码 6 种蛋白: 两个横纹肌型(α -心肌型, α -骨骼肌型), 两个平滑肌型(α -血管平滑肌型, γ -内脏平滑肌型)和两个细胞质型(β 和 γ 亚型)(Vandekerckhove *et al*, 1978)。 β -肌动蛋白基因氨基酸编码区高度保守, 原鸡、鼠、人 β -肌动蛋白氨基酸序列相似性为 100%。 β -肌动蛋白除有基因序列高度保守的特征外, 还具有 mRNA 的表达数量高, 而且

数量稳定, 几乎不随年龄产生变化的特点, 在测定某种 mRNA 的表达量时, 常采用 β -肌动蛋白 mRNA 作为内标(Hua *et al*, 1999)。鳊鱼属硬骨鱼类鲈形目、暖鲈科、鳊亚科、鳊鱼属, 是我国特有的淡水鱼珍品, 经济价值极高, 因其具有特殊摄食习性而受到众多研究者的关注。许多研究者正致力于研究有关鳊鱼摄食与脂肪蓄积基因调控的分子机制, 但有关鳊鱼 β -肌动蛋白基因序列尚未见报道。研究鳊鱼摄食与脂肪蓄积调控相关基因的表达特征需要可靠的特异外标引物, 为此, 本研究中采用 RT-PCR 及 RACE 法, 分离、克隆鳊鱼 β -肌动蛋白基因 cDNA 全序列, 再用基因组步行法(Genome Walker)克隆鳊鱼 β -肌动蛋白基因 5'调控区。将所得序列与各科动物的 β -肌动蛋白基因序列

* 国家自然科学基金项目, 30670367 号; 广东省自然科学基金项目, 031886 号; 国家高技术研究发展计划项目(863), 2007AA09Z437 号; 广东省科技计划项目, 2005B20301005 号、2007B020701002 号; 广州市科技计划项目, 2006Z3-E0551 号。刘秀霞, 硕士, E-mail: xiuxia_791016@163.com

通讯作者: 梁旭方, 教授, 博士生导师, E-mail: tliangxf@jnu.edu.cn

收稿日期: 2007-10-25, 收修改稿日期: 2007-12-10

进行比较分析, 并对其上游调控序列的功能进行初步分析, 确定其启动子区。旨在为进行定量 RT-PCR 提供可靠外标的基础数据, 提高外标引物设计的正确性和特异性, 同时也为转基因研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)购自广州市石牌市场, 体重约 500g。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

从鳊鱼快速分离肝脏组织, 总 RNA 的提取与纯化按 Promega 公司的 SV Total RNA Isolation System 试剂盒推荐方法进行。cDNA 第一链的合成使用 TaKaRa RNA LA PCRTM Kit (AMV) Ver.1.1 试剂盒, 以鳊鱼肝脏总 RNA 为模板, oligo(dT)₁₈ 为反转录引物, 操作按试剂盒推荐方法进行。

1.3 鳊鱼肝脏 β -肌动蛋白 cDNA 核心片段的克隆

根据已知脊椎动物 β -肌动蛋白氨基酸序列的保守区域设计合成一对简并引物:

ACT01F :5'-TGGCAGGCAGAGACCTGACGGA
CTATCTGATGAA-3'

ACT02R :5'-CTCATCATATTCCTGCTTGCTGAT
CCACAT-3'

预期 PCR 产物片段大小为 1050bp。以上述 cDNA 为模板, 用 *Taq* DNA 聚合酶(Takara)进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 94 预变性 3min, 94 1min、50 1min、72 1min, 共 30 个循环, 最后 72 延伸 5min。

1.4 鳊鱼肝脏 β -肌动蛋白基因 5 端 cDNA 扩增

根据克隆得到的鳊鱼 β -肌动蛋白的 cDNA 核心片段及 5'-Full RACE Core Set 试剂盒(TaKaRa)要求设计 5'RACE 反转录引物 RT :5'-(P)GCAACTCTCAGCTCA-3' 和两对 PCR 引物, S1 :5'-GTATCCTGACCC TGAAGT-3'; A1 :5'-TCATCACCAACGTAGCTGT-3'; S2 :5'-TGACATGGAGAAGATCTGG-3'; A2 :5'-CCA TACCGACCATCACTC-3'。5'RACE 的操作按试剂盒推荐方法进行。取 5 μ l 总 RNA(约 5 μ g), 以 RT 为引物合成 cDNA 第一链后, 加入 RNase H, 分解 mRNA, 接着用 T4 连接酶对单链 cDNA 进行环化。cDNA 环化产物用 TE Buffer 稀释 10 倍备用。首次 PCR 反应体系为 10 倍稀释产物 4 μ l、10 \times PCR buffer 5 μ l、dNTP (2.5mmol/L each) 4 μ l、*rTaq* 酶 0.25 μ l, 以及 S1、A1 引物各 1 μ l, 加 ddH₂O 至 50 μ l。PCR 反应条件为:

94 预变性 3min, 随之 94 1min、55 1min、72 1min, 25 个循环, 最后 72 延伸 5min。取首次扩增产物 1 μ l, 用 S2、A2 引物进行二次 PCR 扩增, 扩增条件为: 94 预变性 3min, 94 1min、60 1min、72 1min, 共 30 个循环, 最后 72 延伸 5min。

1.5 鳊鱼肝脏 β -肌动蛋白基因 3 端 cDNA 扩增

根据已克隆的鳊鱼 β -肌动蛋白基因 cDNA 核心片段序列和 3'-Full RACE Core Set(TaKaRa)试剂盒要求设计两个 3'-RACE 上游引物, p1 :5'-CACG AGAC CACCTACAACA-3'; p2 :5'-AGGATGCAGAAGGAG ATCAC-3'。下游引物用试剂盒提供的引物。3'RACE 的操作参照 3'-Full RACE Core Set 试剂盒(TaKaRa)推荐方法进行。首先以试剂盒提供的 oligo dT-3sites Adaptor primer 为引物进行反转录反应, 然后以 p1 和试剂盒提供的 3sites Adaptor primer 为引物进行首次 PCR 反应, 反应条件为: 94 预变性 3min, 94 1min、55 1min、72 1min, 共 30 个循环, 最后 72 延伸 5min; 巢式 PCR 所用引物为 p2 和 3sites Adaptor primer, PCR 反应条件与 5'RACE 二次 PCR 相同。

1.6 基因组步行法克隆鳊鱼肝脏 β -肌动蛋白基因 5 侧翼序列

鳊鱼血液总 DNA 的提取采用 QIAGEN Blood & Cell Culture DNA kit (QIAGEN), 按试剂盒推荐的方法进行操作。基因组步行法采用 BD GenomeWalkerTM Universal Kit (Clontech), 实验操作按试剂盒推荐方法进行。制备的基因组 DNA(2.5 μ g)经 *Dra* I 限制性内切酶 37 酶切过夜后用等体积的苯酚抽提一次, 氯仿抽提一次, 加入二倍体积的无水乙醇和 1/10 体积 3mol/L 的 NaAc 溶液, 混匀, 14000r/min 离心 10min。沉淀用 80%乙醇洗涤一次, 14000r/min 离心 5min, 弃上清, 沉淀空气干燥后, 溶于 20 μ l TE, 取 4 μ l 用于连接反应。连接反应体系组分为: 10 \times 连接反应缓冲液 1.6 μ l, 酶切纯化后的基因组 DNA 4 μ l, 连接头(25 μ mol/L) 1.9 μ l, T4 连接酶 0.5 μ l, 总体积为 8 μ l, 16 连接过夜; 70 加热 5min 终止反应, 加入 72 μ l TE 将连接反应液稀释 10 倍。

取 1 μ l 连接反应稀释液进行首轮 PCR 反应, 反应体系为 10 \times PCR buffer 5 μ l, dNTP (2.5mmol/L each) 4 μ l, 接头引物 AP1 1 μ l, 基因特异引物 GSP1 (5'-GG GAACCGGTTTCAGGCAAATGATAT-3') 1 μ l, 连接反应稀释液 1 μ l, LA *Taq* 酶(Takara) 0.5 μ l, 加 ddH₂O 至 50 μ l; 反应条件为: 94 预变性 3min, 94 1min、

55 1min、72 90s, 共 30 个循环, 最后 72 延伸 5min。将首次 PCR 产物稀释 50 倍, 取 1 μ l 稀释液作为模板进行二次 PCR。PCR 反应体系为 10 \times PCR buffer 5 μ l, dNTP (2.5mmol/L each) 4 μ l, 接头引物 AP2 1 μ l, 基因特异引物 GSP2 (5'-CACAAGCTGCGAATGACGG-3') 1 μ l, 首次 PCR 产物稀释液 1 μ l, LA Taq 酶 0.5 μ l, 加 ddH₂O 至 50 μ l; 94 预变性 3min, 94 1min、60 1min、72 1min, 共 30 个循环, 最后 72 延伸 5min。

1.7 PCR 产物的克隆及序列分析

PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳纯化, H.Q.&Q.Gel Extraction Kit II (U-gene)回收后克隆至 pMD 18-T 载体(Takara), 转化感受态 *E. coli* JM109, 利用 M13 正反向引物, 通过 PCR 反应检测得到阳性克隆, 阳性克隆由博亚公司进行测序。序列同源性分析使用 vector NTI suite 6.0 软件; 鳊鱼 β -肌动蛋白基因 5 侧翼区调控元件的预测使用 TFBIND 软件 (<http://tfbind.ims.u-tokyo.ac.jp/>) (Tsunoda *et al*, 1999)。

2 结果与分析

2.1 鳊鱼肝脏 β -肌动蛋白基因 cDNA 全序列的克隆与分析

以鳊鱼肝脏 cDNA 为模板, 用简并引物 ACT01F 和 ACT02R 进行 PCR 扩增, 得到 1050bp 大小的 PCR 产物(图 1)。将产物电泳纯化、回收后克隆至 pMD 18-T 载体。用 M13 正反向引物进行测序, 得到一个 1042bp 的 cDNA 片段。

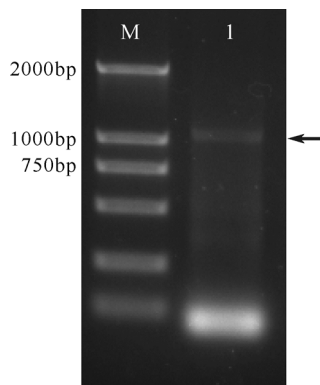


图 1 利用 RT-PCR 法从鳊鱼肝脏扩增得到的 β -actin cDNA 片段

Fig.1 β -actin gene cDNA fragment amplified by RT-PCR from the liver of Chinese perch
M: marker; 1: RT-PCR product

根据克隆的鳊鱼肝脏 β -肌动蛋白基因 cDNA 核心片段设计 7 个特异引物, 利用 5 RACE 和 3 RACE

技术分别从鳊鱼肝脏获得 2 个预期片段大小的 PCR 产物(图 2、图 3)。对这 2 个片段进行克隆、测序, 得到分别为 287bp、948bp 的 cDNA 片段。通过序列拼接, 确定鳊鱼 β -肌动蛋白基因 cDNA 全长为 1897bp, 其中 5 非翻译区(5'-UTR)为 94bp, 3 非翻译区(3'-UTR)为 675bp, 开放阅读框(ORF)为 1128bp, 编码 375 个氨基酸。polyA 加尾信号为 AATAA A(图 4)。

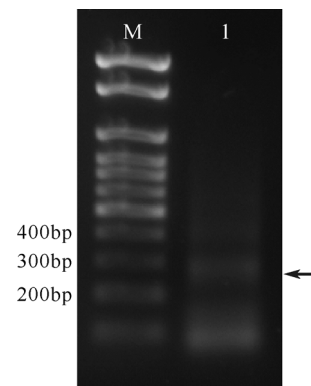


图 2 5' RACE PCR 产物

Fig.2 5' RACE-PCR product

M: marker; 1: PCR 产物。预期条带用箭头表示

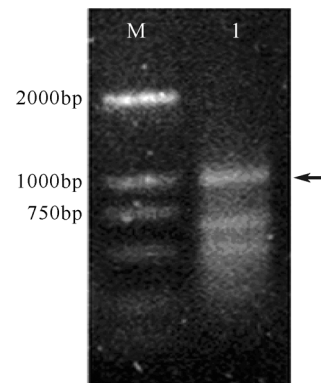


图 3 3' RACE PCR 产物

Fig.3 3' RACE-PCR product

M: marker; 1: PCR 产物。预期条带用箭头表示

应用 Vector 软件, 对鳊鱼与鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)、胡子鲶(*Clarias leather*)、鲮鱼(*Cirrhinus molitorella*)、斑鳢(*Channa maculate*)、非洲爪蟾(两栖类)、原鸡(鸟类)、大鼠、小鼠、人(哺乳类)的 β -肌动蛋白基因序列所推导的氨基酸序列进行同源性分析。结果显示, 鱼类、两栖类、鸟类、哺乳类等不同类群脊椎动物 β -肌动蛋白氨基酸序列同源性极高, 达到 96.2%—100%(表 1), 由此可见, 脊椎动物不同物种间 β -肌动蛋白在氨基酸组成上是高度保守的, 这与它参与构成细胞骨架的重要功能紧密相关。

```

CTCTGAGCGCGTCATTCGACGCTGTGCGGGATATCATTTCCTGAAACCGGTTCCCTTAAAGCGAAAAGC 73
CCCCCACCCAAAGTTCAGCCATGGAAGATGAAATCGCCGCACTGGTTGTGACAACGGATCCGGTATGTGC 145
      M E D E I A A L V V D N G S G M C 17
AAAGCCGGATTCGCCGAGATGACGCCCTCGTGTCTTCCCTCCATCGTCGGTCGCCCCAGGCATCAG 217
K A G F A G D D A P R A V F P S I V G R P R H Q 41
GGAGTGATGGTCGGTATGGCCAGAAGGACAGCTACGTTGGTGATGAAGCCAGAGCAAGAGGGGTATCCTG 289
G V M V G M G Q K D S Y V G D E A Q S K R G I L 65
ACCCTGAAGTACCCCATCGAGCAGGTATTGTGACCAACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACC 361
T L K Y P I E H G I V T N W D D M E K I W H H T 89
TTCTACAATGAGCTGAGAGTTGCCCTGAGGAGCACCCTGTCTGCTCACAGAGGCCCTCTGAACCCAAA 433
F Y N E L R V A P E E H P V L L T E A P L N P K 113
GCCAACAGGGAGAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCGACACCCAGCCATGTACGTTGCCATCCAG 505
A N R E K M T Q I M F E T F D T P A M Y V A I Q 137
GCTGTGCTGCCCTGTATGCCTCTGGTCGTACCACTGGTATCGTCATGGACTCCGGTGATGGTGTGACCCAC 577
A V L S L Y A S G R T T G I V M D S G D G V T H 161
ACAGTGCCCATCTATGAGGGCTACGCCCTGCCACCGCCATCCTCGCTGCTGACTTGGCCGGCCGACCTC 649
T V P I Y E G Y A L P H A I L R L D L A G R D L 185
ACAGACTACCTCATGAAGATCTGACAGAACGTGGTACTCCTCACCACCAGCCGAGAGGGAAATCGTG 721
T D Y L M K I L T E R G Y S F T T T A E R E I V 209
CGTGACATCAAGGAGAAGCTGTGGTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGGCACCGCTGCCTCCTCC 793
R D I K E K L W Y V A L D F E Q E M G T A A S S 233
TCCTCCCTGGAGAAGACTACGAGCTGCCGACGACAGGTCATCACCATTGGCAATGAGAGGTCCGGTGC 865
S S L E K S Y E L P D G Q V I T I G N E R F R C 257
CCAGAGGCCCTCTCCAGCCTCCTCCTCGGTATGGAGTCTGCGGAATCCACGAGACCCTACAACAGC 937
P E A L F Q P S F L G M E S C G I H E T T Y N S 281
ATCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGTAAGACCTGTATGCAACACCGTGTCTGAGAGTACCACCATG 1009
I M K C D V D I R K D L Y A N T V L S G G T T M 305
TACCCTGGCATCGCCGACAGGATGAGAAGGAGATCAGACCCCTGGCCCATCCACCATGAAGATCAAGATC 1081
Y P G I A D R M Q K E I T A L A P S T M K I K I 329
ATTGCCCACTGAGCGTAAATACTCTGTCTGGATCGGAGGCTCCATCCTGGCCTCTCTGTCCACTCCAG 1153
I A P P E R K Y S V W I G G S I L A S L S T F Q 353
CAGATGTGGATCAGCAAGCAGGATACGATGAGTCCGGCCCTCCATCGTCCACCAGCAATGCTTCTAAACA 1225
Q M W I S K Q E Y D E S G P S I V H R K C F 375
GACTGTTCTCTCCCTCCCAACCAAAATGCCCAAACTTCAGCTCTGTGCAAAACAACCACACGCCAC 1297
ACATTTCTACACTCAGCGCAGAGCCTAGATGACCAACTATTGGCATGGCTTCAGTTATTTTTGGCGC 1369
TTGACTCAGGATTTAAAAAAAATCGAACGATGAAGGAGACAGTAATGTTTTGGCTAGGTTAAAAAGAG 1441
AGCACCCAGGGTTCTGCAGTTGCATCTGGGACTTAAAAAATGTACATTTTGTCTTTCTTTGAGTCATT 1513
CCAAATGTTTGTAACTGCATTGTTTCAGACACATGATCCAAATGTTAACTGCATTGTTTCAGACACGATT 1585
GCCTCTGTGAAGGCTGCCAGTGGTTGGCGCATACTTAAACATGGTTGTAGTATCGCTTGTATGTAATAT 1657
GTCTGGGTTTTTGTACTTTCAGCCTTAAAAATCTGGTCTGTTTAAATTTTTTGTGTTTGTATGCAAAA 1729
CCCAATCGTGACCTTCTCCCTGTGGAGGTTTATCTGGGGTGGTGGGCAAGGGGTCTCGAAGTGAT 1801
GGGGTAACATGGGGTCCAGACCGGTGGGGCCACTGTACTGACTAAACAATCCCAATAAAGTGCACATG 1873
TGTTCCCAAAAAAAAAAAAAA 1897

```

图 4 鳊鱼β-actin 基因 cDNA 全序列及推测的氨基酸序列

Fig.4 The nucleotide sequence of Chinese perch β-actin cDNA and predicted amino acid sequence
起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA 用黑体表示, polyA 加尾信号(AATAAA) 用下划线标示

高等动物细胞内的β-肌动蛋白基因氨基酸编码区高度保守, 原鸡、大鼠、小鼠和人β-肌动蛋白氨基酸序列相似性 100%, 鳊鱼β-肌动蛋白氨基酸序列与人的β-肌动蛋白氨基酸序列也相差无几。很难计算出鳊鱼与其它脊椎动物β-肌动蛋白的系统发育关系, 为了减少相对误差, 更加准确地反映β-肌动蛋白在进化

中的变化, 作者将鳊鱼β-肌动蛋白核苷酸序列与其它另外 13 个不同物种[鳊鱼、胡子鲶、鲮鱼、斑鳢、莫桑比克罗非鱼(*Tilapia mossambica*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、花溪鱖(*Rivulus marmoratus*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、鲫鱼(*Carassius auratus*)、川鲮(*Platichthys flesus*)、人、大鼠、小鼠、非洲爪蟾、原鸡]进行同源性比较, 用 MEGA2.1 构建β-肌动蛋白系统进化树(图 5)。由图 5 可以看出, 鱼类β-肌动蛋白基因形成一个独立的分化群, 说明鱼类β-肌动蛋白基因起源于一个共同祖先。另外, 从图 5 可以看出, 脊椎动物β-肌动蛋白聚类成 3 个分支, 鱼类在第 1 分支上, 鸟类和哺乳类在第 2 分支上, 两栖类在第 3 分支上, 这种系统发育关系与传统的分类基本一致, 因此, 以β-肌动蛋白为基准的进化树较准确地描述了鱼类、两栖类、鸟类以及哺乳类四大类脊椎动物的亲缘远近关系, 从β-肌动蛋白基因的进化中能看出脊椎动物的进化规律, 如果从分子水平来研究生物进化, β-肌动蛋白是一个非常好的工具。

2.2 鳊鱼肝脏β-肌动蛋白基因 5 侧翼序列的克隆与分析

应用 Genome Walker 技术, 经过两轮 PCR 扩增, 从 Dra I 基因组文库中扩增得到一约 1400bp 的 PCR 条带(图 6), 将该条带回收、克隆、测序后得到一 1399bp 的 DNA 片段。以基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 反应进一步确认该片段为鳊鱼β-肌动蛋白基因的 5 侧翼序列。

对鳊鱼β-肌动蛋白基因 5 侧翼序列进行分析, 发现在起始密码子 ATG 上游 113bp、1009bp 处有 2 个 TATA box, 在 9bp、473bp、1167bp、1365bp 处有 3 个 GC box, 在 55bp、337bp、660bp、782bp、1205bp、1347bp 处有 6 个 GATA 元件, 在 183bp、287bp 处有

表 1 鳊鱼、鳙鱼、鲢鱼、鲮鱼、斑鳢、非洲爪蟾、原鸡、大鼠、小鼠和人β-actin 氨基酸序列的同源性(%)

Tab.1 Homology (%) of β-actin amino acid sequence among Chinese perch, bighead carp, catfish, mud carp, Taiwan snakehead, African clawed frog, chicken, Norway rat, house mouse and human

种类	非洲爪蟾	鳙鱼	鲢鱼	原鸡	鳊鱼	小鼠	人	鲮鱼	大鼠
鳙鱼	96.8								
鲢鱼	96.2	98.9							
原鸡	99.5	97.3	96.7						
鳊鱼	98.9	96.8	96.2	98.4					
小鼠	99.5	97.3	96.7	100.0	98.4				
人	99.5	97.3	96.7	100.0	98.4	100.0			
鲮鱼	96.4	98.2	99.4	97.0	96.4	97.0	97.0		
大鼠	99.5	97.3	96.7	100.0	98.4	100.0	100.0	97.0	
斑鳢	98.8	98.3	98.3	98.3	98.8	98.3	98.3	98.1	98.3

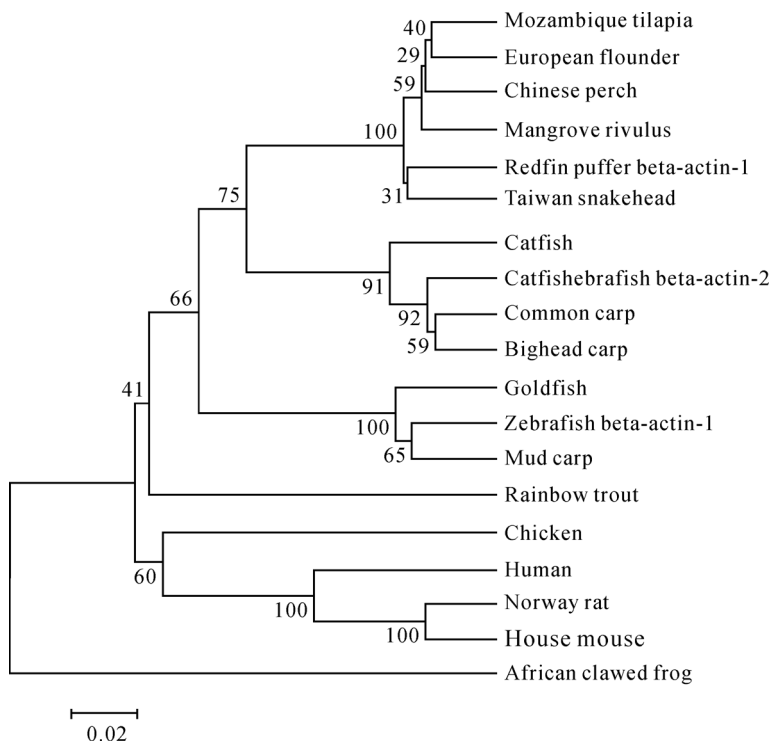


图 5 采用非加权组平均法基于核苷酸序列构建鳊鱼和其它生物的 β-actin 基因系统树

Fig.5 Phylogenetic tree of β-actin based on nucleotide sequences obtained by UPGMA method

注：采用 Clustal X 1.81 软件和 Mega 3 软件构建系统树，1000 次重复计算靴带值

2 个 CAAT box, 在 131bp、427bp 处有 2 个 MYOD 元件, 在 146bp 处有 1 个 CArG box, 在 612bp、821bp、978bp 处有 3 个 YY1 元件, 在 717bp、752bp、852bp、1239bp 处有 4 个 SP1 元件(图 7)。

3 讨论

本研究中克隆得到的鳊鱼β-肌动蛋白基因 cDNA 全长为 1897bp, 其中 5 非翻译区(5'-UTR)为 94bp, 3 非翻译区(3'-UTR)为 675bp, 开放阅读框(ORF)为

1128bp, 编码 375 个氨基酸。polyA 加尾信号为 AATAA A。鳊鱼β-肌动蛋白氨基酸序列与鳙鱼、胡子鲶、鲮鱼、斑鳢、非洲爪蟾、原鸡、大鼠、小鼠、人β-肌动蛋白氨基酸序列的同源性分析显示, 鱼类、两栖类、鸟类、哺乳类等不同类群脊椎动物β-肌动蛋白氨基酸序列同源性均在 96%以上, 说明脊椎动物不同物种间β-肌动蛋白的氨基酸序列存在高度的保守性。使用氨基酸序列来构建鳊鱼与其它脊椎动物β-肌动蛋白基因的系统发生树不是太理想, 这是因为它们氨基酸序列的同源性太高(大于 96%), 包含的进化信息太少, 所以作者在这里使用了核苷酸的信息。结果显示, 以β-肌动蛋白为基准的进化树较准确地描述了鱼类、两栖类、鸟类以及哺乳类四大类脊椎动物的亲缘远近关系, 从β-肌动蛋白基因的进化中能看出脊椎动物的进化规律, 表明β-肌动蛋白可作为生物大

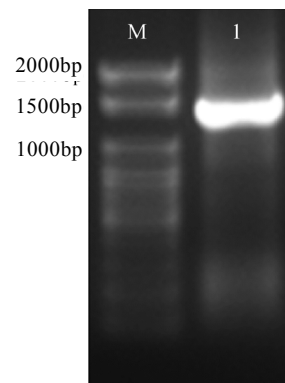


图 6 基因组步移法 PCR 产物电泳图

Fig.6 Genome Walker-PCR product
M : marker; I : PCR product

类群进化的分子标志, 值得进一步研究。随着越来越多的肌动蛋白基因的克隆和序列测定, 对基因本身结构、功能和表达的研究也逐步深入, 这将更利于了解肌动蛋白的保守性和变异性与生命起源和进化的关系。

脊椎动物的 β -肌动蛋白基因一般位于染色体 2q, 其启动子序列一般包含 1 个 CAAT box, 1 个 TATA box 和 1 个进化保守的 CC(A/T)6GG 序列单元, 称之为 CArG box, 这个基序同样在其它肌动蛋白中存在 (Minty *et al.*, 1986; Ng *et al.*, 1985)。研究认为, 在人 β -肌动蛋白基因中, 在转录起始位点上游 114bp 内的 CAAT box 和 CArG box 是维持启动子活性所必需的, 当切去含有这些元件的片段时, 基因就失去了转录活性 (Danilition *et al.*, 1991)。CArG 结合因子 CBF 调控人的心肌和骨骼肌 α -肌动蛋白和人的 β -肌动蛋白基因的表达, CBF 与 c-fos 血清反应因子几乎没有区别, 所以 β -肌动蛋白基因同样受到血清诱导表达。在鳊鱼 β -肌动蛋白基因 5 调控区中, 作者同样发现了 CAAT box、TATA box、CArG box 等调控元件, 作者还发现了 MYOD、YY1、SP1、GATA、GC box 等潜在调控元件。

因 β -肌动蛋白基因在机体表达的广泛性和其强启动子活性这两大优点, 使其启动子在转基因动物的研究中发挥着重要的作用 (苏建明等, 2003; Hamada *et al.*, 1998)。如运用 DNA 重组技术, 将人 α -干扰素基因克隆到鲤 β -肌动蛋白基因启动子下游, 已成功构建能在草鱼中表达的人 α -干扰素重组基因 (陈立祥等, 2001)。肌动蛋白基因启动子还常用于绿色荧光蛋白 (GFP) 标记基因的表达。将 GFP 标记基因连接到 β -肌动蛋白基因启动子下游, 可使 GFP 大量表达, 应用于各种涉及发育的研究, 如在转基因青鳞同系繁殖纯化中的应用 (龙华等, 2003)。鳊鱼 β -肌动蛋白基因 5 侧翼序列的克隆成功, 无疑将会有力地推进今

AAAAGTCCACCCTTACCATAATGAAGTGGACCAGGAAGCAGAGATGGCTGTATATGTGTGTGTGTGTATG	72
GATA	
TGTGTGTGTATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTGTTTTTAAATAAAGGTGAATAAGAGCAGGTAAAAC	144
AAAGGGGCTTGATTGATTAAGCTGGAGGCTGGGGAGTGTGATGGTCTATCTGATAGAGGTTAGAGTCTTTG	216
SP1 GATA	
CACTTCCTGCTTCATAGTGGGTCAAATAACATACAATAGCCTAGGTGTTCCCTACATGATTGAAAGGTGGC	288
TGAAACAGCAACTAAAAATCTCTCAGCTAGTACTCACTCAGCGTGTATTTTGGTGGGGTTTTTGGTAATTT	360
TCACAAGGTAGCCTATATATTGTCTGAGGGGTATTATTAACACCTCCATCTAGTAGACTGCAGGCAGCATT	432
YY1	
AAAATCTGAGAATGCTAACAAATCCCATCCTCTCCTGAAACAACACACCTTTATCAAATATTGTATCTCAG	504
GCAGAGAGAGGGAGAGGTAGCCAGCAGCCAGTGGCAGGATATTTAGGAGGAGCCCAAGACCATGTAGCCACA	576
SP1 YY1	
AAGCGCAAGTACTTGATCAATAAATGAACATTATCAGCAAGCATTGGCAGTATGGGGAAGGGTGGCCTGCA	648
GATA SP1	
TAAGTGGCCATCCCTCAGCCTGGGGCAGGGCAGCTCCACTACCCTGTGTGTGTATTGTATGTCATATGTT	720
SP1	
TGACCTGGTGATGCAGTGACTATGAGACCCACTGAGCTTACAGCCGGTTTTCAAATGGCAGCAACATCAG	792
GATA YY1	
CATCCCCTTACCCGCTGTAATGTCTGAAAAATCAAATAGTGTGTCATGTTAATCCAAAGAGAAGAAATGGGAG	864
AGAGGACAGTCTTTGAAAAAAGTCTTGGGCTTTCAGCCTTGACAGGGAGAGTCCAGGGTCCCGAAGC	936
GC box	
TTCAGTTATCATACAAATATGTGCCCACTGCTCAGAGCATGGTGCAGGGAAGACATTGTACACTTATGAA	1008
MYOD	
AGTTTATACATCATTTAGTCTGAATATAAAACAGTATATCAAGAGATTAGGCTTAGTAGGCCTCACAACCTC	1080
GATA	
AATCCCTCCCTTTTATTTCTCCAATCCTTTGCTATTATCGCCTCCCTCTCTCACTCACTGAAATCGCA	1152
CAAT	
GGCACCCAGTGACCACAGTGTGCACGCGACGTGCCCCAGTGCATGACGCTGGACCAACAGAGGGCGCTAT	1224
CAAT	
TCCGAAAGTTTACCTTTTATGGATAGAGCCGGCACTGACGAGTATAAAAATCAGGCGCCACAGCTAAC	1296
CArG box MYOD TATA	
AGATTCAGTCTGAGCGCCGTCATTTCGAGCTTGTGCGGGATATCATTTGCTGAAACCGGTTCCCTTAAAGC	1368
GATA	
GAAAAGCCCCCACCCAAAGTTCAGCCATG	1399

图 7 鳊鱼 β -actin 基因 5 端侧翼区序列

Fig. 7 5'-Flanking sequence of Chinese perch β -actin gene

后转基因鳊鱼的研究工作。

参 考 文 献

- 龙华, 木下政人, 2003. GFP 标记在转基因青鳞同系繁殖纯化中的应用. 遗传, 25(4): 409—413
- 苏建明, 章怀云, 肖调义等, 2003. 绿色荧光蛋白基因重组子的构建及其在鱼类受精卵中的表达. 水产学报, 27(5): 409—414
- 陈立祥, 肖调义, 汪冬庚等, 2001. 人 α -干扰素基因在转基因草鱼中的表达. 湖南农业大学学报(自然科学版), 27(3): 177—178
- Danilition S L, Frederickson R M, Taylor C Y *et al.*, 1991. Transcription factor binding and spacing constraints in the human β -actin proximal promoter. Nucleic Acids Research, 19(24): 6913—6922
- Hamada K, Tamaki K, Sasado T *et al.*, 1998. Usefulness of the medaka β -actin promoter investigated using a mutant GFP reporter gene in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). Mol

- Mar Biol Biotechnol, 7(3): 173—180
- Hua Zhong, Jonathan W S, 1999. Direct Comparison of GAPDH, -Actin, Cyclophilin, and 28S rRNA as Internal Standards for Quantifying RNA Levels under Hypoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 259(3): 523—526
- Minty A, Kedes L, 1986. Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in mouse cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif. *Mol Cell Biol*, 6: 2125—2136
- Ng S-Y, Gunning P, Eddy R *et al*, 1985. Evolution of the functional human β -actin gene and its multi-pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosome dispersion of pseudogenes. *Mol Cell Biol*, 5: 2720—2732
- Sheterline P, Clayton J, Sparrow J, 1995. Actin. *Protein Profile*, 2(1): 1—103
- Tsunoda T, Takagi T, 1999. Estimating transcription factor bindability on DNA. *Bioinformatics*, 15: 622—630
- Vandekerckhove J, Weber K, 1978. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequences of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol*, 126: 783—802
- Welch M D, Holtzman D A, Drubin D G, 1994. The yeast actin cytoskeleton. *Cur Opin Cell Biol*, 6: 110—119

CLONING AND ANALYSIS OF THE FULL-LENGTH cDNA SEQUENCE AND 5'-FLANKING REGION OF CHINESE PERCH *SINIPERCA CHUATSI* β -ACTIN GENE

LIU Xiu-Xia, LIANG Xu-Fang, WANG Lin, DUAN Jin-Xia, LI Guang-Zhao, LIAO Wan-Qin
(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou, 510632)

Abstract Referring to the deduced amino acid sequences of β -actin from other vertebrates, two degenerated primers were designed and synthesized for cloning the cDNA of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) β -actin gene by RT-PCR. The full-length cDNA sequence was further obtained with the method of 3'- and 5'- rapid amplification of cDNA ends (RACE). Genome walker method was applied to get 5'-flanking region of Chinese perch β -actin gene. The complete Chinese perch β -actin cDNA was 1897bp in length, containing an open reading frame of 1128bp (encoding 375 amino acids), flanked by 94bp 5'UTR and 675bp 3'UTR. The sequence analysis reveals that, the identities of β -actin amino acid sequence among Chinese perch, African clawed frog (*Xenopus laevis*), chicken (*Gallus gallus*), Norway rat (*Rattus norvegicus*), house mouse (*Mus musculus*), and human (*Homo sapiens*) are more than 96%. This suggests that β -actin is highly conserved. The phylogenetic tree constructed on the basis of β -actin nucleotide sequence describes accurately the relationship among fish, amphibian, bird and mammals. The result supports that β -actin may be investigated further as a good phylogenetic marker. A 1399bp 5'-flanking region of Chinese perch β -actin gene was obtained using genome walker method, a proximal promoter element, containing highly conserved CAAT, CArG, and TATA boxes, has been found within the first 200bp upstream of the start codon ATG. Other potential regulatory elements including GC box, MYOD, YY1, SP1, and GATA also have been found in this 5'-flanking region. The successful cloning of 5'-flanking region of Chinese perch β -actin gene, lays a foundation for future study on transgenic Chinese perch.

Key words β -actin gene, cDNA sequence, 5'-flanking region, Cloning, Chinese perch