

宽体沙鳅(*Botia reevesae*) β -肌动蛋白基因的 cDNA 克隆与表达分析*

覃川杰¹ 陈立侨^{2①} 岳兴建¹ 李二超²
王永明¹ 邹远超¹ 谢碧文¹ 齐泽民¹

(1. 内江师范学院生命科学学院 内江 641000; 2. 华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘要 利用 RT-PCR 和快速扩增 cDNA 末端(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术首次克隆了宽体沙鳅(*Botia reevesae*) β -肌动蛋白基因的 cDNA 全序列, 该序列全长为 1795bp, 由长 100bp 的 5' 非翻译区(untranslated region, UTR)、570bp 的 3'非翻译区和 1125bp 的开放阅读框(open reading frame, ORF)组成, 编码 375 个氨基酸。宽体沙鳅 β -actin 氨基酸序列包含 1 个糖基化位点、9 个 N-豆蔻酰化位点、3 个 actin 信号位点等主要结构区域。PSI-BLAST 比对表明, 宽体沙鳅 β -actin 氨基酸与真鲷、罗非鱼、虹鳟等鱼类同源性达 99%。NJ 法系统进化分析显示宽体沙鳅 β -actin 首先与鲢聚在一起, 然后与鳊、尖头鲂等鱼类聚在一起。荧光定量 PCR 检测 β -actin 基因在宽体沙鳅脑、鳃、心脏、肝、胃等 12 个组织的表达无显著差异($P < 0.05$), 具有良好的稳定性。

关键词 肌动蛋白; 宽体沙鳅; cDNA; 组织表达

中图分类号 Q953

肌动蛋白(actin)广泛分布于从线虫到人类的动物中, 在不同细胞中均稳定地高丰度表达(Patwary *et al.*, 1996)。肌动蛋白是构成细胞骨架的主要成分(Ma *et al.*, 2007), 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 加工和运输等许多重要生理功能(Pederson, 2000; Tamura *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008)。肌动蛋白基因氨基酸编码区高度保守, 鱼类、两栖类、鸟类、哺乳类等脊椎动物肌动蛋白氨基酸序列同源性均在 96% 以上(刘秀霞等, 2009)。由于肌动蛋白基因 mRNA 的表达几乎不随年龄增长而变化, 在定量分析某基因 mRNA 的相对表达量时, 常采用肌动蛋白基因 mRNA 作为内标基因(Welch *et al.*, 1994)。此外, 自 Perler 等(1980)建立了氨基酸取代与

保守蛋白基因进化年代的线性关系后, 肌动蛋白作为分析遗传进化的分子标记被广泛采用。

宽体沙鳅(*Botia reevesae*)因其体被丰富的黏液, 俗称“玄鱼”, 隶属于鳅科、沙鳅属, 是长江上游及支流特有鱼类。其肉质细嫩、味道鲜美, 营养价值和药用价值兼备; 且体态纤细, 体色艳丽, 体表具美丽的斑纹, 观赏价值高、食用价值高(李强等, 2011)。随着鳅科鱼类资源的开发与利用, 许多研究者正致力于其遗传多样性、抗病机制等生物学特性方面的研究。迄今为止, 尚未有鳅科鱼类 β -actin 基因序列的研究。本研究成功克隆了宽体沙鳅 β -actin 基因全长 cDNA 序列, 为深入研究鳅科鱼类 β -actin 基因的结构和功能提供理论依据, 同时也为研究宽体沙鳅黏液大量分泌表达及抗病机制、种质资源的研究等奠定基础。

* 四川省教育厅项目, 11ZB025 号; 四川省科技厅项目, 2011NZ0075 号; 国家科技支撑计划课题资助项目, 2012BAD25B03 号; 公益性行业(农业)科研专项资助项目, 201203065 号; 内江师范学院大学生创新性实验计划项目, X201207 号。覃川杰, 博士, 讲师, E-mail: qinchuanjie@126.com

① 通讯作者: 陈立侨, 博士, 教授, E-mail: lqchen@bio.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2012-05-27, 收修改稿日期: 2012-07-29

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 宽体沙鳅(*Botia reevesae*)采自四川沱江内江段。选择健康、活力好的宽体沙鳅活体用于实验。

1.1.2 试剂 RNAiso Plus、RNA LA PCRTM Kit、Taq DNA 聚合酶、Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0、pMD18-T Vector、*E. coli* DH5 购自宝生物工程(大连)有限公司; SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第一条链的合成

将宽体沙鳅置于冰上麻醉后处死, 尽快取其肝脏, 液氮速冻后, 于 -80°C 保存备用。取保存的肝脏, 剪碎加入 RNAiso Plus 试剂进行匀浆, 按照试剂说明提取总 RNA。以宽体沙鳅肝总 RNA 为模板, 按照 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV)Ver.3.0 试剂盒方法, 合成 cDNA。

1.3 HL 基因 cDNA 片段的克隆

参照 GenBank 已登录的人(*Homo sapiens*, EAW77536.1)、大鼠(*Rattus norvegicus*, NP_036729.2)、真鲷(*Pagrus major*, BAF31236.1)、斑马鱼(*Danio rerio*, NP_957316.1) β -actin cDNA 序列, 设计并合成引物 K β -S: 5'-CCCCAGRCATCAGGGWGTS-3'; K β -A: 5'-TGTGGTGGTGARGSWGTA-3', Y = C/T; S = C/G; R = A/G; N = A/C/G/T(上海生工)。以宽体沙鳅肝 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 反应体系为: 10 \times PCR buffer, 2.5 μl ; 10mmol/L 的 dNTP Mixes, 0.5 μl ; 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 K β -R, 1.0 μl ; 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 K β -L, 1.0 μl ; rTaq 酶, 0.3 μl ; DEPC H₂O, 19.7 μl ; 反应条件为: 94°C 预变性 4min; 94°C 30s, 40°C 45s, 72°C 60s, 30 个循环; 72°C 延伸 10min。预期 PCR 产物片段大小为 500bp。扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测, 用 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 回收目的片段 PCR 产物, 与克隆载体 pMD18-T 连接, 然后转化感受态细胞 *E. coli* DH5, 挑取阳性克隆送往上海生工生物技术有限公司测序。

1.4 宽体沙鳅 β -actin 基因 5'端 cDNA 扩增

以宽体沙鳅肝总 RNA 为模板, 根据 5'RACE System 试剂盒要求合成 cDNA。以宽体沙鳅 β -actin cDNA 片段, 基因特异性引物 K β 5 5'-AAGTCCAGA CGGAGGATGG-3'。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,

引物为 K β 5 和 UPM5'-CTAATACGACTCACTATAG GGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'。反应条件为: 94°C 预变性 4min; 94°C 60s, 62°C 60s, 72°C 60s, 30 个循环; 72°C 延伸 10min。PCR 产物的纯化、克隆和测序同 1.3。

1.5 宽体沙鳅 β -actin 基因 3'端 cDNA 扩增

以宽体沙鳅 β -actin cDNA 片段, 设计基因特异性引物 K β 3 5'-CCCACACTGTGCC ATCTAT-3'。使用逆转录酶 SMARTscribeTM Reverse Transcriptase 和引物 3'CDS primer A 逆转录肝总 RNA 进行合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 引物为 K β 3 和 UPM, 反应条件同 1.4, 克隆和测序同 1.3。

1.6 宽体沙鳅 β -actin 基因序列与氨基酸序列的同源性分析及分子进化分析

将测序所得宽体沙鳅 β -actin cDNA 序列在 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行同源比较, 提交 NCBI 数据库。根据所得到的 cDNA 序列推导宽体沙鳅 β -actin 氨基酸序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>), 通过 Motif Scan 程序 (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>) 分析蛋白质功能位点。ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 程序预测氨基酸序列的物理参数, Scratch 程序预测二硫键 (<http://www.ics.uci.edu/~baldig/scratch/index.html>)。Clustal W 多重序列比对分析氨基酸序列特点 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)。然后用 MEGA 4.0 软件(Tamura *et al*, 2007), 采用邻位相接法(NJ)构建宽体沙鳅 β -actin 氨基酸序列与其它 25 种动物的 β -actin 氨基酸序列的系统进化树, 采用 Bootstrap 重复 1000 次计算各分支的置信度。

1.7 宽体沙鳅 β -actin 在各种组织中表达分析

分别提取 9 尾宽体沙鳅 12 种组织(脑、鳃、鳍、心脏、肝、精巢、卵巢、肠、皮肤、肌肉、胃、肾、脾)的总 RNA, 按照 TaKaRa PrimeScript[®] RT reagent 方法, 合成 cDNA。以基因特异性引物 K β 3 和 K β 5 进行荧光定量 PCR(Roche LightCycler Nano)。PCR 扩增体系为: cDNA 模板 1 μl 、FastStart Essential DNA Green Master 10 μl 、10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 2 μl 、水 5 μl , 总体积 20 μl 。反应条件为: 95°C 预变性 5min; 95°C 变性 10s、 65°C 退火 30s、 72°C 延伸 30s, 共 45 个循环。

1.8 数据统计及分析

宽体沙鳅 β -actin mRNA 基因相对表达水平用 Livak 和 Schmittgen 建立的 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算(Livak *et al*,

2001)。所有样品重复 3 次,以肝作对照,目的基因相对表达量用平均值±标准差表示,数据分析采用 SPSS 17.0 统计分析软件, Duncan 法进行多重比较,当 P<0.05 时差异显著。

2 结果与分析

2.1 宽体沙鳊β-actin 基因 cDNA 核心片段及 RACE 产物的鉴定

以宽体沙鳊肝脏 cDNA 为模板,用引物 kβ-A 和 kβ-S 进行 PCR 扩增,得到 500bp 大小的 PCR 产物。将产物电泳纯化、回收后克隆至 pMD18-T 载体后测序,得到一个 500bp 的 cDNA 片断。根据克隆的宽体沙鳊β-actin cDNA 核心片段设计 1 对个特异引物 kβ5 和 kβ3,并利用 5'-RACE 和 3'-RACE 技术分别获得 2 个约为 650bp 和 1100bp 的 PCR 产物。对这 2 个片段进行克隆、测序,得到大小分别为 688bp、1190bp 的 cDNA 片段(图 1)。

2.2 宽体沙鳊β-actin 基因 cDNA 全长序列特征

通过序列拼接,确定宽体沙鳊β-actin cDNA 全长为 1795bp (GenBank 登录号: NBK53701),其中 5'非翻译区(5' UTR)为 197bp,3'非翻译区(3' UTR)为 669bp,开放阅读框(ORF)为 1125bp,编码 375 个氨基酸(图 1、图 2)。PSI-BLAST 比对表明,宽体沙鳊β-actin 氨基酸与鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*, AAG17452.1)真鲷(*P. major*, BAD88412.1)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, XP_003455997.1)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*, NP_001117707.1)等鱼类同源性达 99%,与黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*, AAA28321.1)、海胆(*Heliocidaris tuberculata*, AAB66245.1)等同源性达 95%(图 2)。

2.3 宽体沙鳊β-actin 基因氨基酸的序列特征

宽体沙鳊β-actin 基因 cDNA 开放阅读框含碱基 1125bp,GC 含量为 47.97%,编码 375 个氨基酸,预测得到的多肽链分子量大约为 41.75kDa,理论等电点 pI 为 5.30,原子总数 5829,分子式为 C₁₈₅₀H₂₉₀₃N₄₉₁O₅₆₂S₂₃₀。其中,甘氨酸(Gly)、异亮氨酸(Ile)、谷氨酸(Glu)及 Leu 含量最高,分别为 7.7%、7.5%、7.2%、7.2%,色氨酸(Trp)含量最少,为 1.1%(图 3),带负电荷氨基酸残基(Asp+Glu)49 个,带正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)37 个,脂肪族氨基酸指数为 80.98。宽体沙鳊β-actin 氨基酸含有 5 个半胱氨酸(Cys),形成 2 个二硫键,分别连接第 2 位和第 19 位,第 219 位和第 287 位的半胱氨酸(Cys)。经 TMpredserver 跨膜结构分析,

```
1 ACATGGGGACTTTGAGCTCCTCCACACGCAGCTAGTGC GGAAAT
46 CATCAGCTTGTAAACCAATCTTTTAAAGTCGACAAACCCAAACCT
91 AAGTTCAGCC 100
101 ATGGATGATGAAATTGCCGCACTGGTGTGACAACGGATCTGGT
M D D E I A A L V V D N G S G
146 ATGTGCAAGGCCGATTTCGCTGGAGATGATGCTCCCGTCTGTC
M C K A G F A G D D A P R A V
191 TTCCCATCTATTGTGGGTCGCCCCAGACATCAGGGTGTGATGGTT
F P S I V G R P R H Q G V M V
236 GGCATGGGACAGAAGGACAGCTATGTTGGTGTAGAGGCTCAGAGC
G M G Q K D S(Y) V G D E A Q S
281 AAGAGAGGTATCCTGACCTGAAATACCCATTGAGCACGGTATT
K R G) I L T L K Y P I E H G I
326 -GTCACCAACTGGGATGATATGGAGAAGATCTGGCATCACACCTTC
V T N W D D M E K I W H H T F
371 TACAACGAGCTCGCTGTGCCCCGAGGAGCACCCCGTCTGCTC
Y N E L R V A K P H P V(L L
416 ACAGAGGCCCCCTGAACCCAAAGCCAAACAGGGAAAAGATGACA
T E A P L N P K A N R) E K M T
461 CAGATTATGTTTGAGACCTTCAACACCCCTGCCATGTACGTTGCC
Q I M F E T F D G V T H T V P I
506 ATCCAGGCTGTGCTGTCCTGTATGCCTCTGGTCTGACTACTGGT
I Q A V L S L Y A S G R T T G
551 ATTGTGATGGACTCTGGTGTAGGTGTCACCCACCATGTGCCCATC
I V M D S G D G V T H T V P I
596 TATGAGGGTTACGCCCTGCCCATGCCATCCTCCGTCTGGACTTG
Y E G Y A L P H A I L R L D L
641 GCTGGTCTGACTGACTGACTACCTCATGAAGATCCTGACAGAG
A G R D L T D Y L M K I L T E
686 AGAGGCTACAGTTCACCACCACAGCCGAGAGGGAAATTGTCGT
R G Y S F T T T A E R E I V R
731 GACATCAAGGAGAAGCTCTGCTATGTTGCCCTTGACTTTGAGCAG
D I K E K L C Y V A L D H F E Q
776 GAGATGGGCACTGCTGCTTCTCTCATCCCTGGAGAAGAGCTAC
E M G T A A S S S S L E K S Y
821 GAGTGCCTGATGGACAGGTATCACCATCGGCAATGAGAGGTTCC
L P D G Q V I T I G N E R K
866 AGGTGCCAGAGGCCCTGTTCCAGCCATCCTTCTGGGTATGGAA
R C P E A L F Q P S F L G M E
911 TCTTGCGGTATCCATGAGACAACCTTCACTCCATCATGAAGTGT
S C G I H E T Y S F N S I M K C
956 GATGTGGATATCCGTAAGGATCTGTATGCCAACTGTATTGCTC
D V D I R K D L Y A N T V L S
1001 GGTGGTACCACCATGTACCCTGGCATTGCTGACAGGATGCAGAAG
G G T T M Y P T F V A L D H F E Q
1046 GAGATCACATCCCTGGCCCTAGCACAATGAAAATCAAGATCATT
E I T S L A P S T M K I K I I
1091 GCCCCACCTGAGCGTAAATACTGTCTGGATCGGAGGCTCCATC
A P P E R K Y T S V N S I M K C G S I
1136 CTGGCCTCCCTGTCCACATCCAGCAGATGTGGATTAGCAAGCAG
L A S L S T F Q Q M(W I S K Q
1181 GAGTATGATGAGTCTGGGCCATCCATTGTCCACCGCAAATGCTTC
E Y D E) S G P S I V H R K C F
1226 TAAACGGACTGTTACCACCTTACGCGGACTCAAAGTGCAGAGA
*
1271 AAAACTTCAAACGACAACATTGGCATGGCTTTTGTATTATTTTGGC
1316 GCTTGACTCAGGATCTAAAACCTGAAAGGTGAAAGGTGACGACAA
1361 TGTTTTTTGGCAAATAAGCATCCCCGAAGTTCTACAATGCATCCGA
1406 GGACTCAATGTTTTGTTTCTTTAGTCATCCAAATGTTTGTAA
1451 TGCATTGTTCCGAAACTTATTTGCCTCTATGAAGGCTGCCAGTA
1496 ATTGGGAGCATACTAACAGTGTAGTATTGTATGTAATAATTATGTA
1541 ACAAACAATGTCTGGGGTTTTGTACTTTTTCAGCCTTAAATCTTG
1586 GGTTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAAACCTAAACCCCTTCAA
1631 CATTAATAAGTTTCTTTCCCCCGCCCTCCCAAAAAAAGAGT
1676 GAAAAGAAGGGGGGGCAAGTTAGTTGGGGCCATCTGTACACT
1721 AACAAATAAATTTCCATTAAAGTGAACCTGTGTGGGACACCCCCC
1766 CCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

图 1 宽体沙鳊β-actin cDNA 全长及推导的氨基酸序列
Fig.1 Full-length of cDNA and deduced amino acid sequence of β-actin from *B. reevesae*
注:下划线标出 N-糖基化位点,方框标出 N-豆蔻酰化位点,括号内为 actin 信号位点,*表示终止密码子

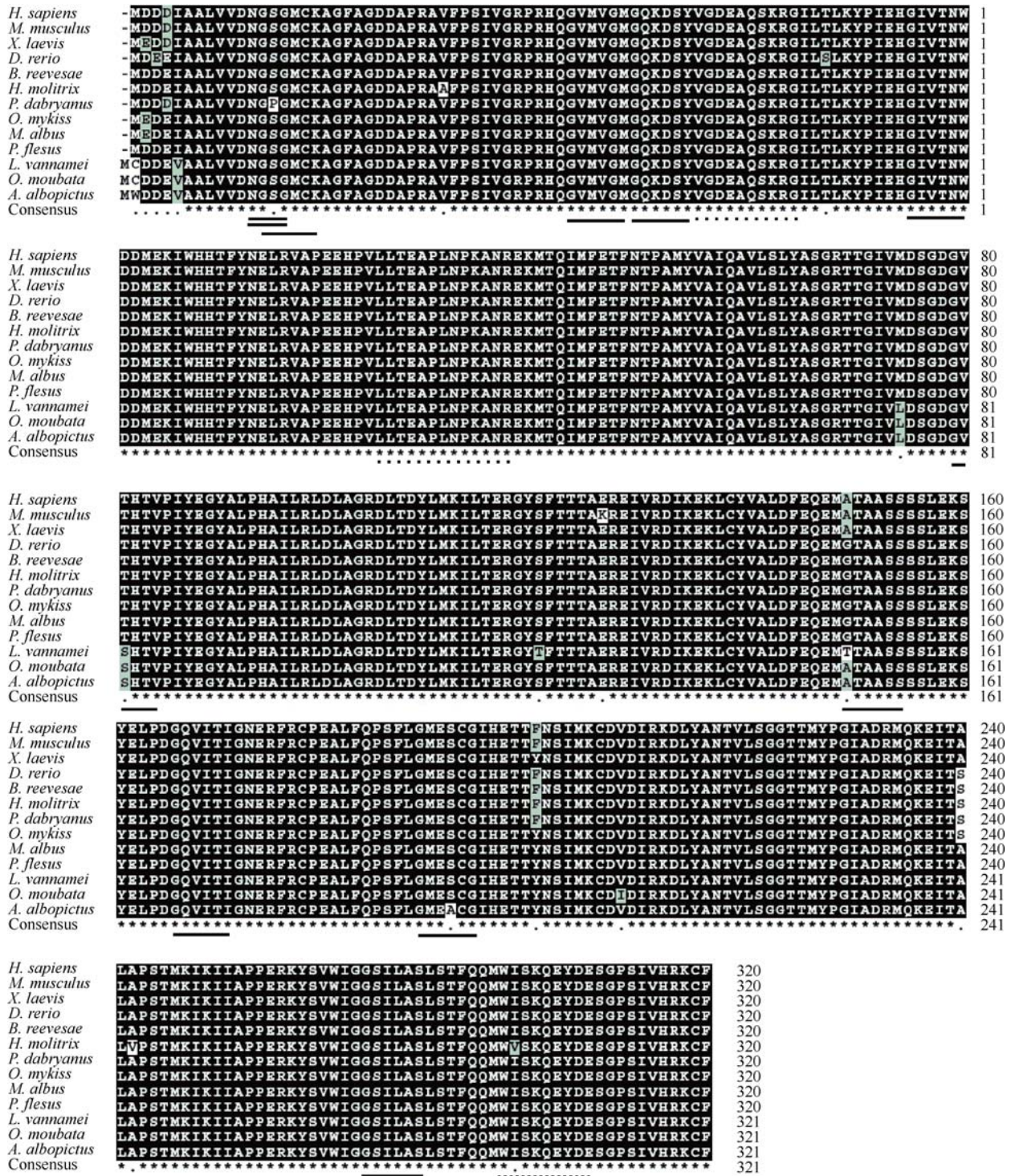


图 2 宽体沙鳅与其它动物的β-actin 氨基酸的多序列比对结果

Fig.2 Alignment of amino acid sequences of β-actin from *B. reevesae* and other species

注: 虚线表示 actin 信号区域, 下划线表示 N-豆蔻酰化位点, 双下划线表示 N-糖基化位点。Homo sapiens, NP_001092.1; Mus musculus, BAE30426.1; Xenopus laevis, NP_001082422.1; Danio rerio, AAH45846.1; Hypophthalmichthys molitrix, AAG17452.1; Paramisgurnus dabryanus, AFA41501.1; Onchorhynchus mykiss, NP_001117707.1; Monopterus albus, AAT69683.1; Platichthys flesus, AAF63665.1; Litopenaeus vannamei, AAG16253.1; Ornithodoros moubata, AAS55945.1; Aedes albopictus, ABG46341.1

发现有 3 个跨膜结构, 分别为第 130—146 位、第 295—310 和第 337—355 位。

Motif Scan 程序分析表明, 宽体沙鳅β-actin 氨基酸序列包含 1 个糖基化位点(NGSG), N-豆蔻酰化位点 9 个, 分别为 GSGMCK、GVMVGM、GQKDSY、GIVTNW、GVTHTV、GTAASS、GQVITI、GMESCG、GSILAS、YVGDEAQSKRG、WISKQEYDE、LLTEAPLPKANR actin 信号位点结构区域(图 1、图 2)。

2.4 宽体沙鳅β-actin 基因系统发育分析

基于β-actin 氨基酸序列采用 MEGA 5.0 软件, 以 NJ 法构建了 25 种动物的系统进化树(图 4), 宽体沙鳅先后与鲢(H. molitrix)、鳊(Elopichthys bambusa)、尖头鳊(Phoxinus oxycephalus)等鱼类聚在一起, 再与两栖类、哺乳类及无脊椎动物聚在一起。宽体沙鳅基于β-actin 基因的分子进化地位与其生物学分类地位基本一致。

2.5 宽体沙鳅β-actin 基因的组织表达分析

荧光定量 PCR 分析表明, β-actin 在宽体沙鳅的脑、鳃、鳍、心脏、肝、精巢、卵巢、肠、皮肤、肌肉、胃均有表达, 且 mRNA 表达水平一致, 无显著差异(P<0.05), 稳定性良好(图 5)。

3 讨论

本研究采用 RT-PCR 及 RACE 技术, 获得了宽体沙鳅β-actin 基因 cDNA 全序列, 首次报道了鳅科鱼类的β-actin。目前对水生生物β-actin 基因的研究主要集中在软体类及鱼类等(Miyamoto et al, 2002)。本次克隆推导的宽体沙鳅β-actin 氨基酸序列不仅与桑天牛(Apriona germari)、白纹伊蚊(Aedes albopictus)、凡纳滨对虾(Litopenaeus vannamei)、浦珠母贝(Pinctada fucata)等无脊椎动物具有很高的相似性, 且与鲢(Hypophthalmichthys molitrix)、非洲爪蟾(Xenopus laevis)、小白鼠(Mus musculus)等脊椎动物也有很高的相似性, 高达 95%—99%, 这符合β-actin 基因氨基酸编码区高度保守的特点(Wang et al, 2008; Zhong et al, 1999), 可能与其参与构成细胞骨架、执行相同的生理功能密切相关。

多重序列比对分析得出, 糖基化区域在凡纳滨

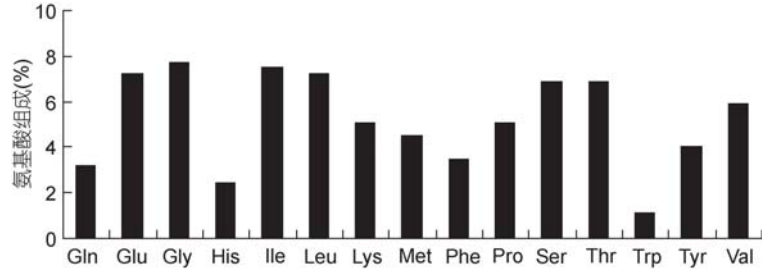


图 3 宽体沙鳅β-actin 氨基酸组成

Fig.3 Amino acid composition of β-actin from B. reevesae

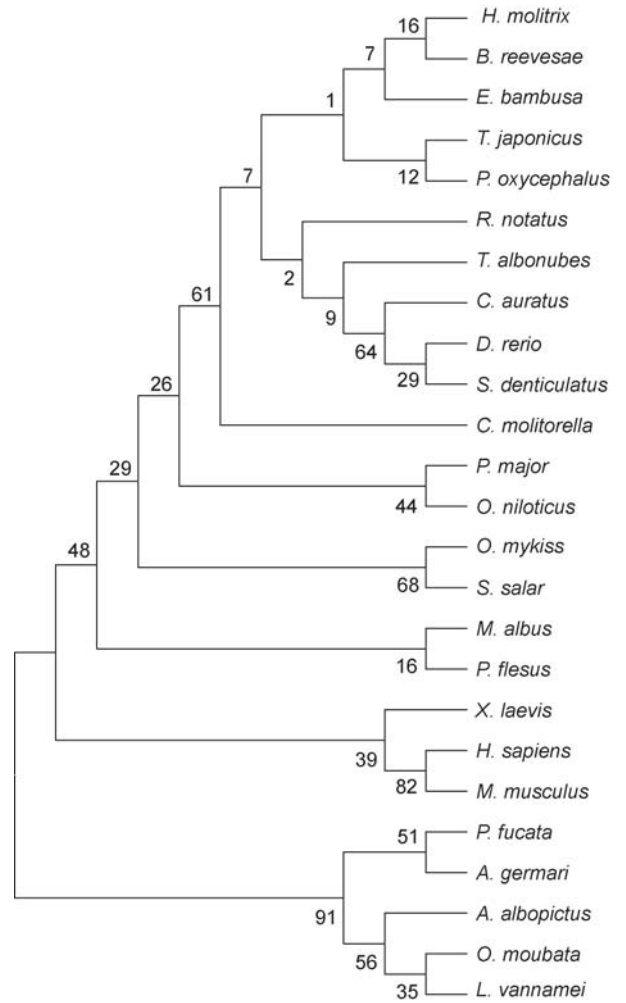


图 4 根据β-actin 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树

Fig.4 NJ phylogenetic tree of β-actin of species 注: Cirrhinus molitorella, AAY25518.1; Elopichthys bambusa, AEK69350.1; Labeo calbasu, AF393832_1; Tigriopus japonicus, AF466279_1; Tanichthys albonubes, ABV48738.1; Tigriopus japonicus, AAQ05018.1; Pagrus major, BAD88412.1; Oreochromis niloticus, XP_003455997.1; Phoxinus oxycephalus, AAF63689.1; Carassius auratus, BAA92339.2; Spinibarbus denticulatus, ABG43102.1; Rhodeus notatus, AAG17453.1; Salmo salar, ACI67042.1; Pinctada fucata, ACD99707.1; Apriona germari, AY817141.1. 其余见图 2

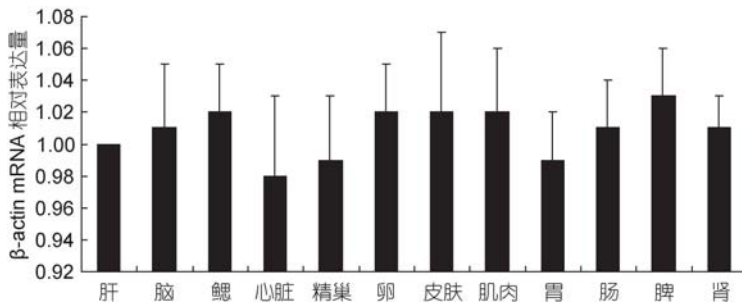


图 5 宽体沙鳅组织 β -actin 基因的定量 PCR 分析

Fig.5 Expression of β -actin mRNA in tissues from *B. reevesae* by quantitative PCR

对虾(*L. vannamei*)、桑天牛(*A. germari*)、鲢(*H. molitrix*)、小白鼠(*M. musculus*)中完全保守, 只存在 NGS 形式(图 2)。3 个 actin 信号区域也非常保守, 存在的形式分别为 YVGDEAQS KRG (YVGDEAQS KRG、YVGDEAQQKRG), LLTEAPLNPKANR (LLTEAPLNPKASR), WISKQEYDE (WVSKQEYDE)。氨基酸残基完全保守的 N-豆蔻酰化位点四个, 分别为 GVMVGM、GQKDSY、GQVITL、GSILAS (图 2)。其它 N-豆蔻酰化位点存在形式分别为 GSGMCK (GPGMCK)、GIVTNW (GIITNW)、GVTHTV (GVSHTV)、GTAASS (ATAAAS、TTAASS)、GMESCG (GMDSCG、GMEACG) (图 2)。此外, 比对结果显示, 宽体沙鳅 β -actin 基因氨基酸非位点区域序列与其它同源序列存在着一定差异(图 2), 类似的差异也存在于在已报道的曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)、鳊(*Siniperca chuatsi*)、三角帆蚌(*Hypriopsis cumingii*)等动物中(Miyamoto *et al*, 2002; 李继姬等, 2011; 袁一鸣等, 2010; 李建林等, 2005; 宋伟等, 2008)。如在贝、虾、天牛、伊蚊等无脊椎动物的 β -actin 氨基酸以 Met-Cys 起始, 后连接 Glu 或 Asp 氨基酸簇, 而脊椎动物均 Met-Asp(Glu)起始, 而脊椎动物缺少 Cys (Kusakabe *et al*, 1997)。多重序列比对分析表明, 动物 β -actin 在进化上非常保守。

以氨基酸序列构建系统发育树, 见图 4。从图 4 中可以看出, 系统发育树的一致性指数比较高, 而且其系统发育分支和现行的分类地位相同。

本研究通过定量 PCR 检测发现, β -actin mRNA 在宽体沙鳅所检的 12 个组织中高度一致。与此前在三角帆蚌、黄颡鱼中的研究一致。一般认为, 由于 β -actin 基因在生物体不同时空的表达高度一致, 可

作为内参基因应用于基因 mRNA 的相对表达实验(Zhong *et al*, 1999; Schmittgen *et al*, 2000)。然而, 近年来有研究认为, 氢化可的松、胰岛素、 17β -雌二醇等多种因素可影响 β -actin 基因的表达(Gorzelnia *et al*, 2001; Verma *et al*, 2006), 且在生物不同的生长阶段 β -actin 基因的表达量有所不同(Moshier *et al*, 1993)。袁一鸣等(2010)认为, β -actin 基因是否能作为分子生物学的内参基因, 需通过实验分析 β -actin 基因是否受实验操作的影响。

参 考 文 献

- 刘秀霞, 梁旭方, 王琳等, 2009. 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. 海洋与湖沼, 40(1): 102—108
- 李强, 姚明宇, 周波等, 2011. 中华沙鳅人工繁殖技术初探. 淡水渔业, 41(5): 92—95
- 李建林, 俞菊华, 唐永凯等, 2005. 黄颡鱼 β -肌动蛋白基因的克隆及序列分析. 中国水产科学, 12(2): 188—192
- 李继姬, 郭宝英, 吴常文, 2011. 曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*) β -肌动蛋白基因的 cDNA 全长克隆与序列分析. 海洋与湖沼, 42(6): 787—793
- 宋伟, 王晓琳, 严维辉等, 2008. 黄颡鱼 β -肌动蛋白基因的克隆及表达分析. 江苏农业学报, 24(3): 263—268
- 袁一鸣, 李家乐, 汪桂玲等, 2010. 三角帆蚌 β -肌动蛋白基因的 cDNA 全长克隆及表达分析. 水产学报, 34(6): 871—880
- Gorzelnia K, Janke J, Engeli S *et al*, 2001. Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. Horm Metab Res, 33(10): 625—627
- Kusakabe T, Araki I, Satoh N *et al*, 1997. Evolution of chordate actin genes: evidence from genomic organization and amino acid sequences. Mol Evol, 44(3): 289—298
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods, 25(4): 402—408
- Ma H M, Mai K S, LiuFu Z G, 2007. Cloning and characterization of an actin gene of *Chlamys farreri* and the phylogenetic analysis of mollusk actins. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 25(3): 304—309
- Miyamoto H, Hamaguchi M, Okosh K, 2002. Analysis of genes expressed in the mantle of oyster *Crassostrea gigas*. J Fish Sci, 68(3): 651—658
- Moshier J A, Cornell T, Majumdar A P, 1993. Expression of protease genes in the gastric mucosa during aging. Exp Gerontol, 28(3): 249—258
- Patwary M U, Reith M, Enchington L K, 1996. Isolation and

- characterization of cDNA encoding an actin gene from the sea scallop (*Placopecten maggelanicus*). *Journal of Shellfish Research*, 15: 265—279
- Pederson T, 2000. Half a century of “the nuclear matrix”. *Mol Biol Cell*, 11(3): 799—805
- Perler F, Efstratiadis A, Lomedico P *et al*, 1980. The evolution of genes: the chicken preproinsulin gene. *Cell*, 20: 555—566
- Schmittgen T D, Zakrajsek B A, 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Biochem Biophys Methods*, 46(1—2): 69—81
- Tamura K, Dudley J, Nei M *et al*, 2007. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1596—1599
- Verma A S, Shapiro B H, 2006. Sex-dependent expression of seven housekeeping genes in rat liver. *Gastroenterology and Hepatology*, 21(6): 1004—1008
- Wang Z L, Wu Z H, Jian J C *et al*, 2008. Cloning and expression of an actin gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850). *Marine Genomics*, 1(2): 63—67
- Welch M D, Holtzman D A, Drubin D G, 1994. The yeast actin cytoskeleton. *Cur Opin Cell Biol*, 6(1): 110—119
- Zhong H, Jonathan W S, 1999. Direct Comparison of GAPDH, β -actin, Cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 259(3): 523—526

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF THE FULL-LENGTH cDNA SEQUENCE OF *BOTIA REEVESAE* β -ACTIN GENE

QIN Chuan-Jie¹, CHEN Li-Qiao², YUE Xing-Jian¹, LI Er-Chao²,
WANG Yong-Ming¹, ZOU Yuan-Chao¹, XIE Bi-Wen¹, QI Ze-Min¹

(1. *School of Life Science, Neijiang Normal University, Neijiang, 641000*; 2. *College of Life Science, East China Normal University, Shanghai, 200062*)

Abstract A 1795bp full-length cDNA sequence of β -actin gene from *Botia reevesae* was obtained with RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique. It consists of a 100bp 5' untranslated region (UTR), a 1125bp open reading frame (ORF) and a 570bp 3'UTR. The translated protein is composed of 375 amino acids. The putative domains include a N-glycosylation, nine N-myristoylation sites, and three actin signature in *B. reevesae*. Sequence comparison indicates that the β -actin deduced amino acid sequence of *B. reevesae* has an overall identity of 99%, 98% and 95% to that of *Pagrus major*, *Oreochromis niloticus* and *Oncorhynchus mykiss*, respectively. Alignment of deduced amino acid sequence to other species shows that the overall structure of β -actin is evolutionarily conserved. Phylogenetic analysis reveals that the *B. reevesae* β -actin is closely related to the β -actin in other fish. Quantitative PCR analysis shows that β -actin was equally expressed in the detected tissues.

Key words actin gene; *Botia reevesae*; cDNA; tissues expression