

浙江枝吻纽虫(*Dendrorhynchus zhejiangensis*) 凝溶胶蛋白和肌动蛋白基因的克隆与序列分析*

陈 蕾¹ 李 晔¹ 苏秀榕¹ 江锦坡² 李太武^{1,2} 李 振¹
周 君¹ 刘 艳¹ 夏长革¹

(1. 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211; 2. 宁波城市职业技术学院 宁波 315100)

摘要 利用已构建的浙江枝吻纽虫 cDNA 文库, 通过 PCR 技术扩增得到 gelsolin 和 actin 基因的全长 cDNA 序列。其中, gelsolin 的 cDNA 全长 1947bp, 5'-非翻译区 62bp, 3'-非翻译区 778bp, 开放阅读框 1107bp, 编码 369 个氨基酸; actin 的 cDNA 全长为 1830bp, 5'-非翻译区 167bp, 3'-非翻译区 532bp 以及 1131bp 的开放阅读框, 编码 377 个氨基酸。序列分析表明: gelsolin 包含 3 个 gelsolin-like (G) 结构域, 分别含有 Ca²⁺、actin、PIP₂ 结合位点, actin 序列中包含了 gelsolin、ATP、profiling 结合位点。比对结果表明, actin 基因氨基酸序列与其它物种的同源性达到 94%—99%。

关键词 浙江枝吻纽虫, 凝溶胶蛋白, 肌动蛋白, 基因克隆

中图分类号 Q18

浙江枝吻纽虫(*Dendrorhynchus zhejiangensis*), 属于纽形动物门(Nemertea)、异纽目(Heteronemertea)、纵沟虫科(Lineidae)、枝吻纽虫属(*Dendrorhynchus*), 是一类生活在浅海潮间带的无脊椎动物, 虫体为长形、圆柱状或背腹扁平呈带状。头部不明显, 前端常有眼点和其它感觉器官。内部构造有一些分节性, 但外表无分节现象, 体表具纤毛, 具有纽形动物门所特有的结构——吻系统, 捕食时吻可由口翻出, 当环境不良时可通过排出吻进行防御, 另外, 纽虫具有很强的再生能力及身体的自发断裂现象。根据其独特的吻系统、组织结构特征、分枝模式和运动方式, 将其命名为浙江枝吻纽虫(*Dendrorhynchus zhejiangensis*)(吕慈仙等, 2008)。在进化系统中, 处于扁形动物和环节动物之间。

目前国内外关于纽虫的研究很少, 一般主要集中在形态解剖学或生理生化方面, 很少在分子水平上对它的生理现象进行深入研究。国内对纽虫的研究主要是关于其营养成分分析(吕慈仙等, 2007)、新种

的分类(尹左芬等, 1984, 1985, 1986; 孙世春, 1994; 吕慈仙等, 2008)、神经系统结构的分析(王晓安等, 2003)以及渗透压调节的研究(吴斌等, 2007), 而纽虫的运动及再生能力相关基因的研究仍然为空白。本实验用的纽虫为采自浙江省奉化市的浙江枝吻纽虫, 体壁肌肉中含有大量的肌动蛋白和凝溶胶蛋白。肌动蛋白(actin)是在真核细胞进化中高度保守的一种蛋白, 主要参与细胞运动和肌肉收缩。凝溶胶蛋白(gelsolin)最早于 1979 年由 Yin 和 Stossel 在兔肺巨噬细胞中发现(Yin *et al.*, 1979), 证实其能以钙依赖的方式调节肌动蛋白的重组, 促使细胞质 gel-sol 的相互转换。在微摩尔 Ca²⁺存在时, gelsolin 即可切断肌动蛋白纤丝并对纤丝封端, 进一步阻止单体肌动蛋白添加到纤丝的倒刺末端。而对于处于聚合状态下肌动蛋白丝, gelsolin 又具有钙依赖性的肌动蛋白成核活性, 能够激发肌动蛋白单体聚合成肌动蛋白纤丝。本文主要研究了浙江枝吻纽虫的 gelsolin 和 actin 的基因序列并加以分析, 可为进一步研究 gelsolin 和 actin 两者的相互

* 浙江省重大科技攻关项目, 2006C13089 号; 浙江省教育厅科研项目, 20070951 号。陈 蕾, E-mail: chen_lei_happy@163.com

通讯作者: 李太武, 教授, 博士生导师, E-mail: litaiwu@nbu.edu.cn

收稿日期: 2010-05-15, 收修改稿日期: 2010-08-09

作用机制, 阐明纽虫的运动、肌肉收缩以及再生等生理现象的机制提供重要的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

研究中所用的浙江枝吻纽虫(*Dendrorhynchus zhejiangensis*)采自浙江省奉化市湖头渡(29.6° N, 121.6° E)沿岸的虾塘中, 带回实验 RNA 提取试剂盒(Promega 公司); 克隆质粒 pMD18-T 和 Taq DNA Polymerase (TaKaRa 公司); 胶回收试剂盒(Biospin 公司); DH5 感受态细胞由实验室保存; 引物由上海英俊技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 对已构建的浙江枝吻纽虫 cDNA 文库进行测序和比对分析后, 从中筛选到长度为 330bp 的 gelsolin 部分核心序列和长度为 1037bp 的 actin 部分核心序列。根据已获得的部分核心序列设计引物, 分别用以扩增 gelsolin 和 actin 的 3'和 5'端的序列。其中 gelsolin 的 3'端的引物为: G-R(5'-ACCTTCCCTTGTCGTGCTAAT-3'), 扩增 5'端的引物为: G-F(5'-GCGGAAAGGACATCTACCA-3'), actin 的 3'端的引物为: A-R(5'-CGTATGCGTCTTCTGTCCC-3'), 5'端的引物为: A-F(5'-ATCAGGAAGGACCTCTA TGCC-3')。为了进一步确认所得序列的正确性, 作者根据核心序列、3'端序列和 5'端序列的拼接结果, 再次设计引物分别对两条基因的 ORF 进行扩增。扩增 gelsolin ORF 的引物为: G-R'(5'-CGGGATCCATGTCTGGACTTGTAAAA-3')和 G-F'(5'-CCCAAGCTTCAAGCCATGAGTGTCTT-3')。扩增 actin ORF 的引物为: A-R'(5'-CGGGATCCATGTGTGACGACGAGAAT-3')和 A-F'(5'-CCCAAGCTTTTGAAGCATTTCTGTG-3')。

1.2.2 基因扩增 根据 cDNA 文库设计扩增 5'端和 3'端引物, 分别与载体上的通用引物 T7(5'-TAAATACGACTCACTATAGGG-3')、T3(5'-ATTAACCTCACTAAAGGGAA-3')进行 PCR 扩增。以 cDNA 文库菌液为模板, 用 TaqDNA Polymerase 进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 94 5min、94 30s、58 30s、72 1min, 共 35 个循环, 最后 72 延伸 10min。

1.2.3 目的基因的分子克隆和鉴定 用胶回收试剂盒回收电泳后的 PCR 产物, 然后取适量的 PCR 回

收产物与克隆载体 pMD18-T Vector 连接, 转化至大肠杆菌后, 在含有氨苄的 LB 平板培养基中培养 8—12h, 挑取单菌落进行 PCR 检测, 将阳性克隆送上海英俊技术有限公司测序。测序结果用 BLAST 软件进行扩增片段同源性分析。

1.2.4 序列分析 用 DNA Star、MEGA 3.1 等软件对测序结果进行编辑, 剪除引物区, 并把编辑好的序列在 GenBank 数据库中进行同源性检索, 获取同源性高低不同的其它物种的序列。用 ClustalX 软件进行核苷酸序列多序列对位分析, 用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树。

2 结果

2.1 Gelsolin、actin 的 PCR 扩增

2.1.1 Gelsolin 基因 以浙江枝吻纽虫 cDNA 文库菌液为模板, 扩增获得 gelsolin 的 5'端序列长约 460bp, 3'端序列长约 1000bp 和 1100bp 的 ORF 区域(图 1)。

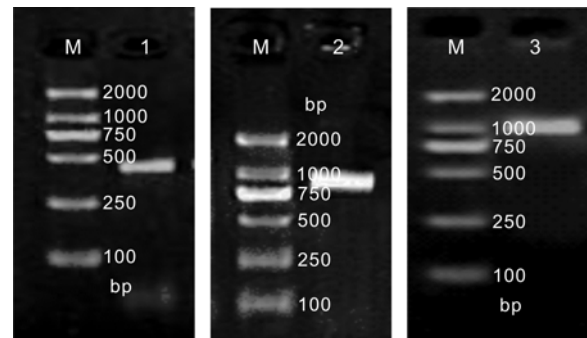


图 1 浙江枝吻纽虫 gelsolin 的 PCR 扩增产物电泳图
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of *D. zhejiangensis* gelsolin
M: DL2000 Marker; 1: gelsolin 5'端扩增产物; 2: gelsolin 3'端扩增产物; 3: gelsolin ORF 扩增产物

2.1.2 Actin 的基因 以浙江枝吻纽虫 cDNA 文库菌液为模板, 根据已设计的 actin 引物, 扩增获得长约 300bp 的 actin 5'端序列, 长约 1100bp 的 actin 3'端序列和约 1100bp 的 actin ORF 序列(图 2)。

2.2 基因序列分析

2.2.1 Gelsolin 基因 通过序列拼接, gelsolin 的 cDNA 全长序列为 1947bp, 其中 5'-非翻译区为 62bp, 3'-非翻译区为 778bp, 该序列包含一个 1107bp 的 ORF, 编码 369 个氨基酸; polyA 加尾信号为(AATAAA)(图

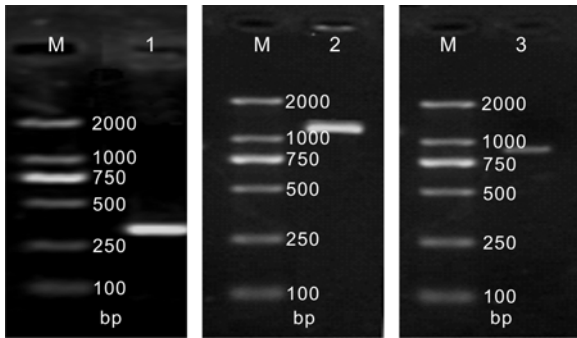


图 2 浙江枝吻纽虫 actin 的 PCR 扩增电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of *D. zhejiangensis* actin

M: DL2000 Marker; 1: actin 5'端扩增产物; 2: actin 3'端扩增产物; 3: actin ORF 扩增产物

3), 含有三个典型的相似的凝溶胶蛋白功能域, 每个结构域分别包含了 Ca^{2+} 、actin、磷脂酰肌醇二磷酸

(polyphosphoinositide 4,5-bisphosphate, PIP_2)结合位点, 在 ExPASy Proteomics tools 软件上对纽虫 gelsolin 的分子量和等电点进行估算, 分别为 42.714kDa 和 5.72。将获得的浙江枝吻纽虫的 gelsolin 在 NCBI 上进行蛋白水平上同源性比较, 得到同源关系相对较近的 7 个物种的氨基酸序列: 海绵(*Suberites domuncula*, CAC87029)、海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*, LOC588119)、陆正蚓(*Lumbricus terrestris*, CAD434051)、海葵(*Nematostella vectensis*, EDO49235)、曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*, EDW58455)、粒棘刺丝虫(*Echinacoccus granulosis*, AAK00053)、大乳头水螅(*Hydra magnipapillata*, LOC100198), 同源性分别为 63%、65%、63%、64%、63%、63%、63%(图 4)。

2.2.2 Actin 序列分析 经拼接得到的浙江枝吻纽虫 actin 全长 cDNA 序列为 1830bp, 包括 167bp 的 5'-

非翻译区, 532bp 的 3'-非翻译区和 1131bp 的开放阅读框。其中 3'-非翻译区含一个 poly(A)尾巴和一个加尾信号(AATAAA)(图 5)。ORF 编码 377 个氨基酸, 分子量为 41.816 kDa, 等电点为 5.30。actin 序列中包含了能与 gelsolin、ATP 和泛变应原肌动蛋白抑制蛋白(profilin)相结合的结合位点。将该序列在 NCBI 上比对, 保守性很高, 其中与海扇贝(*Placopecten magellanicus*, AAB02227)、线虫(*Caenorhabditis elegans*, CAB04676)、果蝇(*Drosophila ananassae*, EDV38176)、章鱼(*Octopus vulgaris*, ACM777881)、褐鼠(*Rattus norvegicus*, CAA24529)、陆正蚓(*Lumbricus terrestris*, CAA65364)、野猪(*Sus scrofu*, ACD13863)等几个物种的 actin 核苷酸同源性达到 88%, 氨基酸具有高达 99%的同源性(图 6)。

2.3 基因进化分析

2.3.1 Gelsolin 的基因系统发育分析 应用 MEGA3.1 程序将部分其它物种的 gelsolin 的氨基酸序列与浙江枝吻纽虫 gelsolin 的氨基酸序列进行比较, 并用邻接法(neighbour-joining method)构建系统进化关系(图 7)。由图 7 的拓扑结构和分枝长度可以看出: 浙江枝吻纽

```

1  GAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATATGTCCTGGACTT
1  M S G L
75  GTAAAACCAAAGAAGTACGATTGGAAGGATTCACACCTTGCCCTGTTCGGCAGTAACTCGAGAAAGACATCAAA
5  V K P K K Y D W K D S N L A L F G S K L E K D I K
150 CAGGCAGCAGCTGAGACTGAGAAGCCTGGCAGGTAGTGAACGCTGAGGACAAACCCGGCTCTTCATCTGGAGG
30  Q A A A E T E K A W Q V V N A E D K P G L F I W R
225 ATTGTTAAATTCGTCCTACTCCATGGCCCAAGGAAGATTACGGAAGTTCTTCAACGGCGACAGCTATATCATT
55  I V K F V P T P W P K E D Y G S F F N G D S Y I I
300 CTAACAANAATACCAGAAGGAAGTGAAGAAGACTGGGAATACGACGCCATTTCTGGATCGGTGCTCAGCTACT
80  L N K Y Q K E G E E D W E Y D A H F W I G A H S T
375 CAGGATGAGTATGCCACAGCCGATACAAGACTGTGAACCTTGACACCTACCTAAAAGACAAGGCCATCCAGCAT
105  Q D E Y G T A A Y K T V E L D T Y L K D K A I Q H
450 AGAGAAGTCCAGAACCAGGAGTCCGACCTTTTAAAGACTACTCAATGAGTTGACATCCTTGAAGGTGGTCT
130  R E V Q N H E S D L F K S Y F N E L F I G A G G A
525 GAGAGTGGATTACAGACTGTGCAACCTAAATCTCAAAATCCAGGTTAATCCAGATTAGACAGACAAGGAAAA
155  E S G F R H V E P K S Y K S R L I Q I R H D K G K
600 GTCCGTGCCGATGAGGTACCTTACTAGAAAATCCCTCAACTCTGATGACATTTTGTGTTGACTCGCGAAAG
180  V R A D V P F T R K S L N S D I F V D W C G K
675 GATATCTACCAGTTCACGGAAAGACTGTAACTAAAAGAGAAAATGAAGGCAACTGACTACGTGAACAACTC
205  D I Y Q F N G K T C N L K E K M K A T D Y V N K L
750 AAAGATCAGCACAATGATGACATACAGATGAGAGCTCAGCAGAAATGGAGGAAATGAGAGTTGAAGTTCAAG
230  K D Q H N A K L H I T D E S S A E W R E I E D F K
825 TCCTTCTCTGATGAGGAAATGTTGAAGAACCAGAGCCGAAAGTGTCTCAGAAATGCAAGGTACTCTACAGG
255  S L L P D E E I V E E P E P E G A G E C K V L Y R
900 GTGCTGATAAAGAGTGCATAATGGAAAATACCAAGATTGCCGAGGTAATTTGAGCAAGGCGATGCTCAAGAGG
280  V S D K S G K L E I T K I A E G E N L S K G M L K R
975 GAGGATGCTTCTTATGATACCTGGTAAGGAATGACAGTTGGATCGGTAGGAATGCCTCAAAAGCCGAGATT
305  E D V F F I D T G K E L T V W I G R N A S K A E I
1050 CAATGTGGTATGGTCTACGGACACAACCTCTTGAAGGACAAGCCAAACCCATCCGTCCTATTTCGCAAGTCAAG
330  Q C G M V Y G H N F L K D K P N P I R P I R Q V R
1125 GATGGCAGGGAGGACAAGGAATTCACAAGCACTCATGGCTTGAGGATGCTAGTGTAAAGACTTAAACCGTGC
355  D G R E D K E F Y K T L M A
1200 GTTAAAGCAACCAGCGGGTAGATTTTCATTGAAGTTTACATTATTACATATAGGACAACAGAGATGCCATTTC
1275 AGGGTAAATATAAGTAGTTTGTCTGGGGACAAGGAAGTACATATTAATACATTACCGGTGTAACGTGCAGTTA
1350 GCTACCTTATTGCGAGGTGACGCTCATCGTGGACCATCTTGATATACGTTGAACCAGAAATATTGCAACTAAG
1425 AAACATTACTACAACAGGATTTTGAGATGCTCTTCAATCTTTTGAATTTGGGCAGAAATAGTATGGTATGCCAC
1500 CATAGACCATCTTGATGACGTTGAACAGGATTACATGCAACCCCTGTTACTATTTGAGCTGCTTTAAATAC
1575 CTTTGAATAGGCATATAGGAGTAAATCAGAATGTATTTGTTTACATCTTTGCAGTTAGAGAAATCTGCATCAA
1650 ATGACAAATTTGTAGCAGTAGACGTTCCACCTTGGGAAAGAAATGCTATCCACTATTAGTTTAAAAACAAAACAT
1725 GTATTTTGTTTACATCTTTGCGAGTTAAGAGAAATCTGCATCAAAATGACAAATTTGTTAGCAGTAGACGTTCAACT
1800 TGGAAAGAATGCTATCACACTATAGTTTAAATACAAAACAAATGATTTGCTTATCCGCTCCTGTTTCTTACGTAC
1875 AAGATTGGCTCATTGACATGTTTTGAAAAATAAGAACAAATGTTTTATTGACAATAAATTTTCCAAGTACATAA
1950 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 3 浙江枝吻纽虫 gelsolin 基因的 cDNA 序列

Fig.3 Schematic diagram of the cDNA of *D. zhejiangensis* gelsolin

注: 空白框表示起始密码子; 阴影下划线表示加尾信号

虫的 gelsolin 与陆正蚓(*Hydra magnipapillata*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)相近,但与日本血吸虫(*Chistosoma japonicum*)和细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*)的同源性相对较远。

2.3.2 Actin 的基因系统发育分析 应用 MEGA3.1 软件将克隆的浙江枝吻纽虫 actin 的氨基酸序列与太平洋牡蛎、虾夷扇贝等物种的 actin 进行同源性比对,构建了系统发育树(图 8),由图 8 看出,首先将对的几个物种的 actin 粗分为 α 和 β 两种类型,本研究得到的浙江枝吻纽虫的 actin 处于 α 类型分枝内,与陆正蚓(*Lumbricus terrestris*)的 actin 在同一个分支上,同源性最接近,且与虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)和太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)的 α 型 actin 亲缘关系较近。

3 讨论

纽虫是人们了解较少的一类无脊椎动物,在进化系统中,处于扁形动物和环节动物之间,具有完全消化系统,在动物的演化中最先出现了初级的闭管式循环系统。纽虫多数种类靠体壁中发达的环肌与纵肌的收缩运动及间质的支持作用来完成运动。纽虫动物的肌肉纵贯或围绕整个身体,有的种类的肌肉甚至贯穿整个内脏,在运动中起着重要作用。纽虫动物具有很强的再生能力及身体的自发断裂现象。当高温的夏季或受其它强烈刺激时,身体可自行断裂成许多碎片,以后每

个碎片可再生成一个完整的个体,这种现象被认为是纽虫动物的一种无性生殖方式。王孟前等(2010)利用 18SrDNA 对本实验材料浙江枝吻纽虫的分类地位

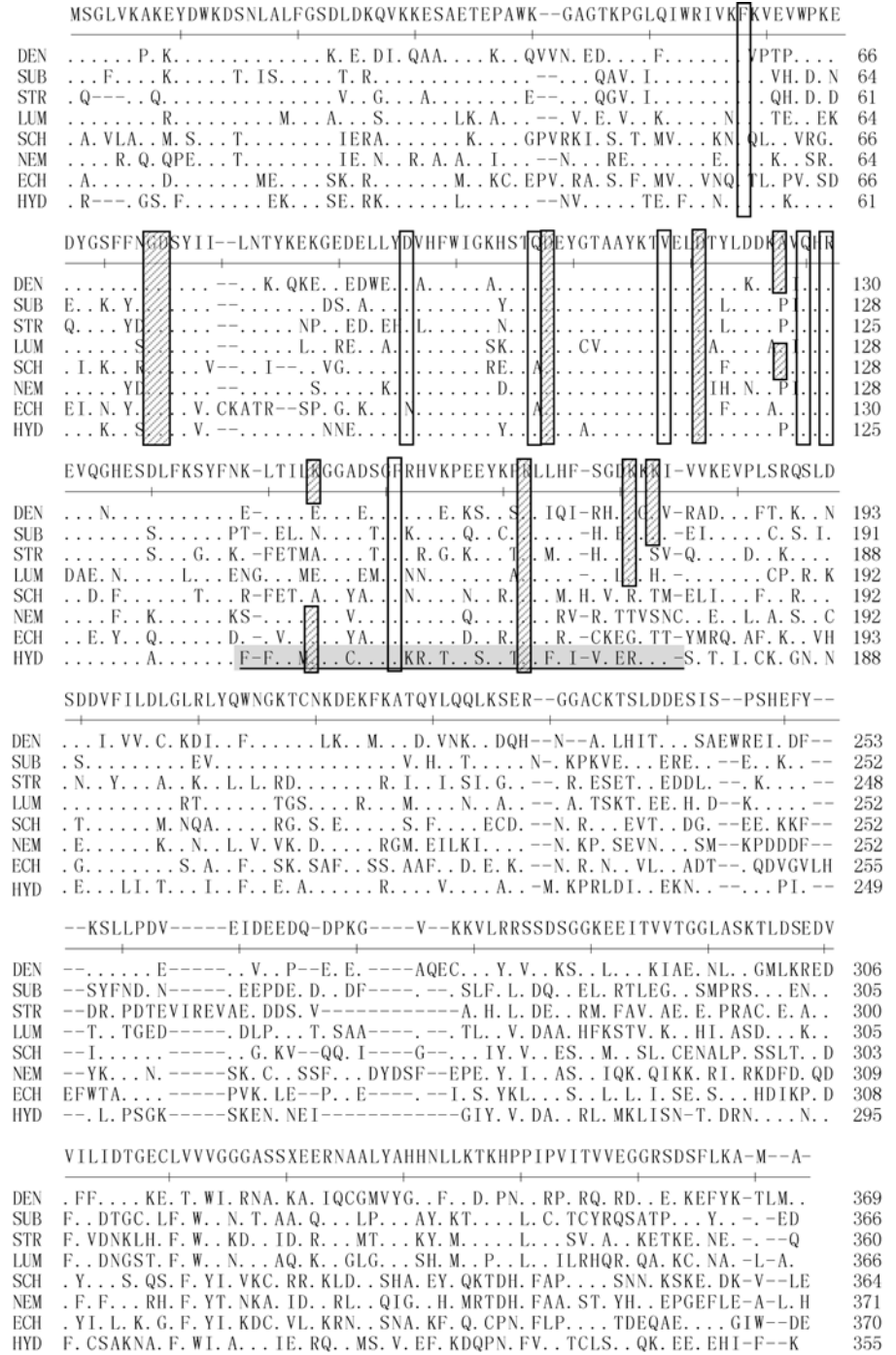


图 4 浙江枝吻纽虫 gelsolin 基因的氨基酸序列的同源性比对
 Fig.4 Amino acid sequence alignments of gelsolin from *D. zhejiangensis*
 注: DEN: *Dendrorhynchus zhejiangensis*; SUB: *Suberites domuncula*; STR: *Strongylocentrotus purpuratus*; LUM: *Lumbricus terrestris*; SCH: *Schistosoma mansoni*; NEM: *Nematostella vectensis*; ECH: *Echinococcus granulosus*; HYD: *Hydra magnipapillata*. 空白框表示 Ca²⁺结合位点,斜线框表示 actin 结合位点,阴影下划线表示 PIP₂结合位点

```

1   GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCTCTAGAGATTATTAACCCCTACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCC
75  ACCCGGTTGGCGGCCCTCTAGAAGTAGTGGATCCCCGGGGTGCAGGAATTCGGCAGCAGGGTTAACCCGTGTA
150 GGATAAAACACCCGACAACATGTTGTGACGACGAGAATCCAGCTTTGGTAGTTGACAAATGGCTCCGGCATGTGCAAG
1   M C D D E N P A L V V D N G S G M C K
225 GCCCGTTTCGCGGAGACGATGCTCAAGAGCTGATTCCCATCTATCGTCGGACGCCCGCTCATCAGGGTGTG
20  A G F A G D D A P R A V F P S I V G R P R H Q G V
300 ATGGTCGGTATGGGACAGAAAGACGCCCTACGTCGGGTGATGAGGCCAGAGCAAGAGAGGTATCCTGACCCTGAAG
45  M V G M G Q K D A Y V G D E A Q S K R G I L T L K
375 TACCCATCGAGCAGGATCGTACAACTGGGACGATATGGAGAAGATCTGGCATCACACATTCTACAACGAG
70  Y P I E H G I V T N W D D M E K I W H H T F Y N E
450 CTTGCGGTTGCCCGAGAAGACACCCGCTCCTCTCTGTGAGGCTCCGCTCAACCCCAAGGCCAACAGGGAAAAG
95  L R V A P E E H P V L L S E A P L N P K A N R E K
525 ATGACCCAGATCGTTCGAGAGCTTCAACAGCCAGCCATGTACGTCGCCATCCAGGCTGCTCTCTATAC
120 M T Q I M F E T F N S P A M Y V A I Q A V L S L Y
600 GCCTCCGGTGTACCACTGGTATCGTTCGATGATGGTGTACCCACACCGTCCCATCTACGAGGGT
145 A S G R T T G I V L D I G D G V T H T V P I Y E G
675 TATGCTCTCGCTAGGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCG
170 Y A L P H A I I R I D L A G R D L T D Y L M K I L
750 ACCGAGCGTGGTACTCATTACAACACCGCCGAGAGAGATCGTTCGTCGATCAAGGAGAAGCTCTGCTAC
195 T E R G Y S F T T T A E R E I V R D I K E K L C Y
825 GTCGCTTGCATTCGAGCAGAGATCCAGCTACCGCTGCTTCATCCAGCTTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCG
220 V A L D F E Q E M A T A A S S S S L E K S Y E L P
900 GACGGTCAGTTCATCACCATTGGTAACGAAAGATTCAAGTGTCCAGAGTCCCTTTCCAGCCCGCCTTCTGGGT
245 D G Q V I T I G N E R F R C P E S L F Q P A F L G
975 ATGAGTCTGCTAGGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCGATTCG
270 M E S A G I H E S T F N S I M K C D V D I R K D L
1050 TACGCCAAGCTGTCATGCTGGTGGCACCACCATGTACCCAGGTATTGCTGACCGTATCGAGAAAGAAATCACT
295 Y A N T V M S G G T T M Y P G I A D R M Q K E I T
1125 GCCCTTGCACCAAGCACCATGAAGATCAAGATCATTGCCCCACGAGAGGAAGTACTCCGATCGATGAAGAGGCG
320 A L A P S T M K I K I I A P P E R K Y S V W I G G
1200 TCCATCCTGCATCCCTGTCCACCTTCCAACAGATGTGGATCAGCAAGCAAGAAATACGAGGAGTCCGGTCCATCC
345 S I L A S L S T F Q Q M W I S K Q E Y D E S G P S
1275 ATCGTCCACAGGAAATGCTTCTAAATTCGCGTTTGACCTCAGCGAAGAGAGAGCAGGTTAATCCAGGAAC
370 I V H R K C F
1350 GGCCTTCCAGCCCTGGTGAATTAATCGTTGCCCAATGACTCTGATGCTGATTCAATTTATATACGCAAGAAATGCT
1425 TTTCTAAGACTTTTAACTCTGAAATACAACCTCTGAGAATAGACTGTGATAACACAATCTCTGTGACATGACTCG
1500 CCTAAATCTTAGCTTAACAACCTTAATGTTACGTTCTAAAACGATACCTTTGTTACTCTCTGAAATATGAT
1575 CTTTTATTCAAGGCTCGGGTCTACTGAGGAATCTCCCTCTAAAAGTAAATCGTGTAGATGACAGCACTGTT
1650 CTAAGTGTGCTGTGCAATTCAGTTGGATTGGAATGATTTCTCTAAACAACGATACATCCTACTGTTTGTGTGT
1725 TGAAGGAATCCTTTCGGCAACATGTCAGTAAATTTGGTTGTAATGTAATGCTAATGCAAAGATGTAATAATAA
1800 TTATCCTTTTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 5 浙江枝吻纽虫 actin 基因的 cDNA 序列

Fig.5 Schematic diagram of the cDNA of *D. zhejiangensis* actin
注: 空白框表示起始密码子; 阴影下划线表示加尾信号

做了进一步确认, 得出浙江枝吻纽虫与脑纹纽虫 (*Cerebratulus lacteus*)的亲缘关系最近。另外, 关于纽虫运动、再生的研究较少, 这些都颇受学者关注。

Actin 是真核生物细胞中普遍存在的非常保守的一种重要基因家族, 是微丝的主要构成成分。微丝进一步参与细胞形态和极性的维持、内吞作用、胞内运输、细胞收缩及运动、细胞分裂等功能(秦玉明等, 2010)。Actin 有两种基本形式, 单一多肽链的球状的肌动蛋白单体(G-actin)和聚合的肌动蛋白纤丝(F-actin), G-actin 可以粗略地分为 α 、 β 和 γ 三种类型, 编码不同的肌动蛋白同工蛋白, 它们含有较多的酸性氨基酸, 等电点约为 5.5, 其中 α -actin 又称为肌肉型 actin, 主要存在于各类肌细胞中, 由于其 N 末端的氨基酸残基的变化导致等电点最低($pI = 5.4$)(刘卫东

等, 2008)。浙江枝吻纽虫 actin 基因属于 α 类型, 而纽虫体壁真皮下为发达的肌肉层, α -actin 应该是高表达基因。Actin 具有多种结合位点, 可与不同的肌动蛋白结合蛋白(actin binding proteins, ABPs)相结合以完成多种细胞功能。ABPS 在肌动蛋白纤丝聚合及解聚的动态变化中发挥重要的调节作用。

Gelsolin 是 ABPs 中的一种, 对微丝具有剪切、封端和成核作用(曲东明等, 2007)。扩增得到的 actin 序列中包含了 gelsolin 的结合位点。已获得的大多数物种的 gelsolin 有六个相似的结构域, 分为 N 末端和 C 末端两个部分, 每部分包括 3 个含有至少 120 个氨基酸组成的结构域(G1-3 和 G4-6), 是由 1 个 折叠和外侧面连接的 2 个 螺旋组成的折叠结构。其中, G1 和 G4 可以结合 actin 单体, G2 只能结合 actin 微丝。G1、G4 和 G6 存在 Ca^{2+} 的结合位点, G2 存在 PIP_2 的结合位点(姜瑜, 2009; 韩晓曦等, 2007)。浙江枝吻纽虫的 gelsolin 有三个相似的结构域, 分别包含了 Ca^{2+} 、actin、 PIP_2 结合位点。Gelsolin 与

actin 的相互作用可以对肌动蛋白丝产生聚合、解聚和剪切作用。Gelsolin 在非活化状态时是紧缩在一起的, 当有微摩尔钙离子存在时, Ca^{2+} 与 gelsolin 结合使之活化, 其构象发生改变, 暴露出 actin 的结合位点, 可以破坏 actin-actin 之间的非共价键连接, 从而将 actin 微丝切断, 进一步可以在新微丝露出的末端形成覆盖, 阻断其进行连接, 从而导致 actin 微丝细胞骨架的解聚。 PIP_2 与 gelsolin 结合后可以使 gelsolin 从覆盖在 actin 微丝的末端解离出来, 去除其对 actin 微丝的覆盖作用, 使 actin-actin 之间可以重新连接, 恢复 actin 微丝细胞骨架网络结构(Yukio *et al*, 1998; McGough *et al*, 2003; Silacci *et al*, 2004)。Gelsolin 对 actin 微丝细胞骨架的效应使其与细胞的运动性、形

状、生长以及凋亡等特性联系起来,在多种生理和病理环境中发挥重要的作用。研究表明,培养的小鼠成纤维细胞,可因凝溶胶蛋白的过表达而使其迁移效率增加 125%。因为细胞运动速度取决于肌动蛋白的更新率,凝溶胶蛋白是通过肌动蛋白的更新来加速细胞运动的,因此是肌动蛋白转换的重要调节因素(Cunningham *et al.*, 1991)。凝溶胶蛋白基因敲除的小鼠,破骨细胞运动性会显著降低,从而阻碍了破骨细胞形成细胞黏附结构,这也表明,凝溶胶蛋白与细胞的运动性是相关的(Chellaiah *et al.*, 2000)。一种钙调节蛋白 calponin 通过与 gelsolin 相结合形成高亲和力的复合体而抑制 gelsolin 的成核活性(Ferjani *et al.*, 2006)。最新研究表明, gelsolin 的活化与细胞的运动性高度相关,缺失 gelsolin 的培养细胞运动性下降,过表达 gelsolin 的细胞运动性增加。Gelsolin 除了在重组肌动蛋白丝中发挥作用以外,还在细胞运动、控制细胞程序性死亡等细胞活动中发挥重要的作用。此外,已报道 gelsolin 在人类多种恶性肿瘤中表达,其表达水平与肿瘤大小、侵袭性生长等密切相关(倪晓光, 2007)。凝溶胶蛋白各个结构域的结构分析和功能分析已有研究,但整个凝溶胶蛋白分子在体内对肌动蛋白作用的结构基础和调控机制尚未完全明确。本文中克隆获得了纽虫的 gelsolin 和 actin 基因的全长 cDNA 序列,并对两条基因进行了详细的构造解析和同源性比对,这将为进一步研究 gelsolin 和 actin 之间的相互作用机制,阐明纽虫的

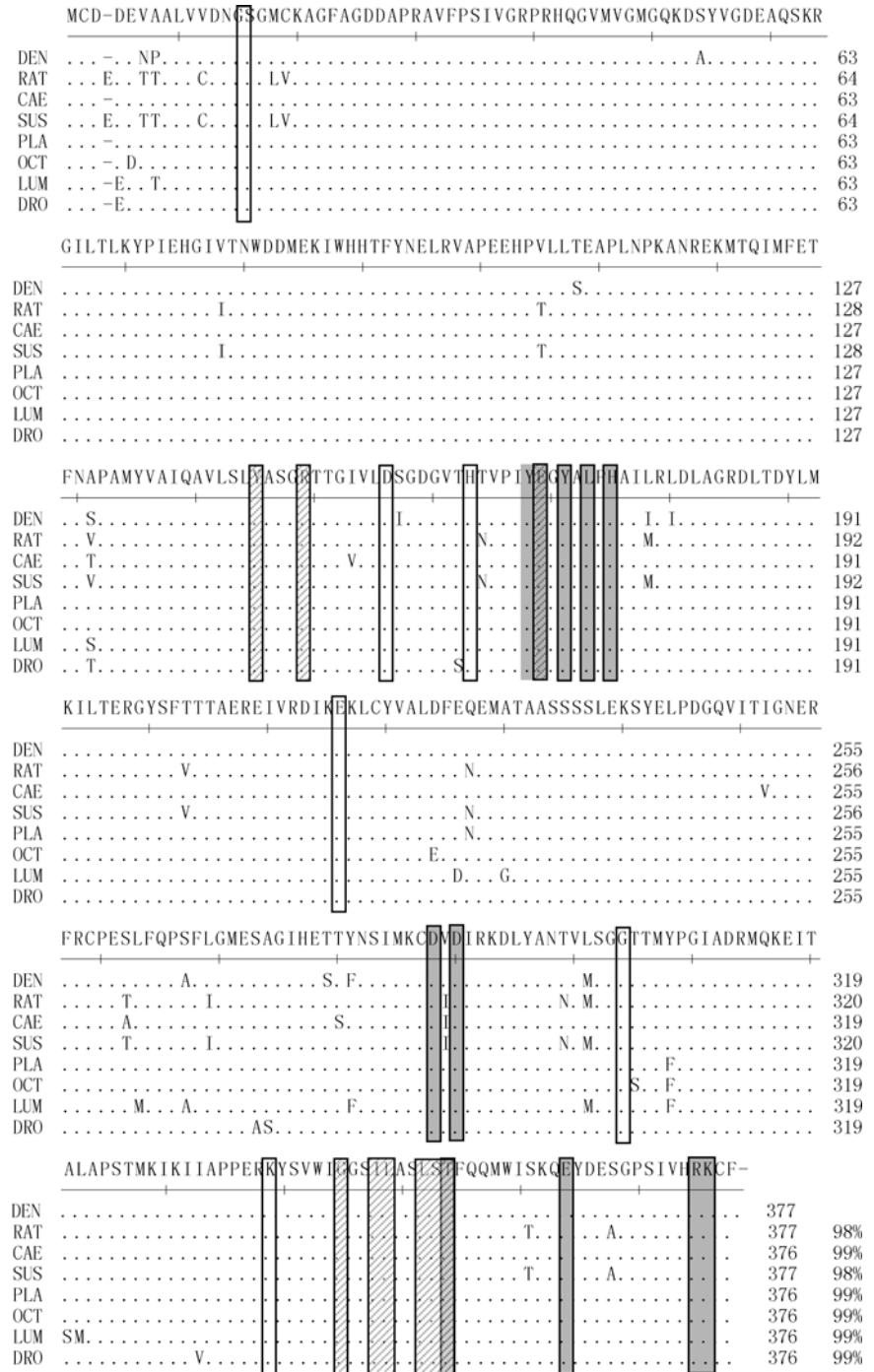


图 6 浙江枝吻纽虫 actin 基因的氨基酸序列的同源性比对

Fig.6 Amino acid sequence alignments of actin from *D. zhejiangensis*

注: DEN: *Dendrorhynchus zhejiangensis*; RAT: *Rattus norvegicus*; CAE: *Caenorhabditis elegans*; PLA: *Placopecten magellanicus*; OCT: *Octopus vulgaris*; LUM: *Lumbricus terrestris*; DRO: *Drosophila ananassae*; SUS: *Sus scrofu*. 空白框表示 ATP 结合位点, 斜线框表示 gelsolin 结合位点, 阴影框表示 profilin 结合位点

细胞运动、肌肉收缩以及再生这些生理现象的机制提供重要的参考依据。

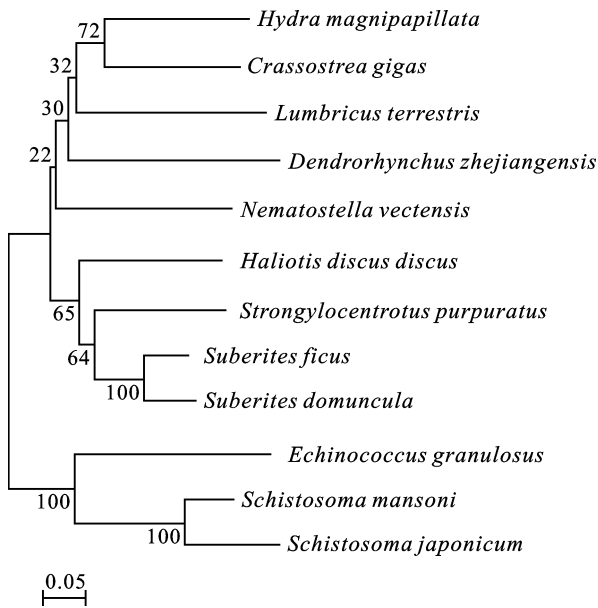


图 7 浙江枝吻纽虫 gelsolin 基因的氨基酸序列系统进化树
Fig.7 The phylogenetic tree constructed based on the amino acid sequences of *D. zhejiangensis* gelsolin

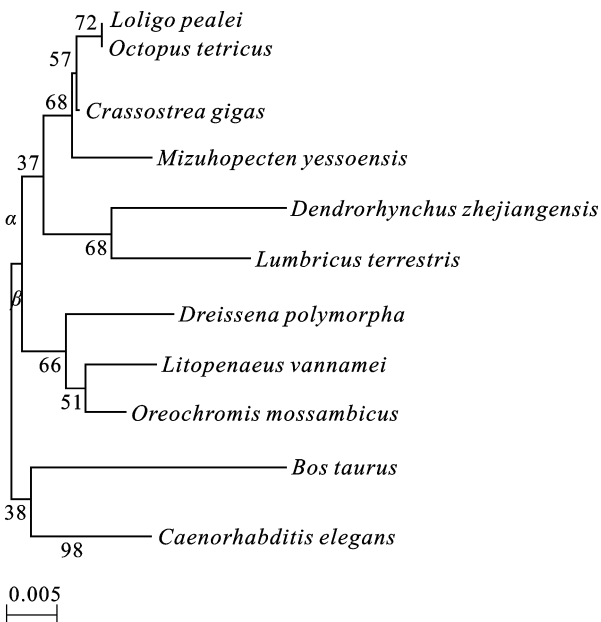


图 8 浙江枝吻纽虫 actin 基因的氨基酸序列系统进化树
Fig.8 The phylogenetic tree constructed based on the amino acid sequences of *D. zhejiangensis* actin

参 考 文 献

- 王孟前, 李太武, 江锦波等, 2010. 浙江沿海一新纽虫的 18S rDNA 序列研究. 科技通报, 26(1): 67—71
 王晓安, 蒋小满, 2003. 纽虫神经系统结构及一氧化氮合酶的组织化学定位. 烟台师范学院学报, 19(3): 163—168
 尹左芬, 曾 葵, 1984. 纵沟纽虫科(Lineidae)、枝吻纽虫属

- (*Dendrorhynchus*) 的一新种——湛江枝吻纽虫(*D. zhanjiangensis*)的研究. 海洋通报, 3(6): 51—58
 尹左芬, 曾 葵, 1985. 异纽类纵沟纽虫科一新属新种——中华枝吻纽虫. 海洋与湖沼, 16(4): 323—336
 尹左芬, 曾 葵, 1986. 纵沟纽虫科(Lineidae)具分枝吻纽虫的一新属新种——疣多枝吻纽虫(*Polydendrorhynchus papillaris*). 山东海洋学院学报, 16(4): 1—9
 曲东明, 韩 梅, 温进坤, 2007. 肌动蛋白结合蛋白. 细胞生物学杂志, 29: 219—221
 吕慈仙, 李太武, 苏秀榕, 2007. 5 种可食性海洋动物氨基酸成分的比较分析. 宁波大学学报, 20(3): 315—319
 吕慈仙, 李太武, 江锦波等, 2008. 浙江沿海最新发现一种枝吻类纽虫. 水产科学, 27(12): 652—654
 刘卫东, 赫崇波, 刘 彤等, 2008. 虾夷扇贝肌动蛋白基因 cDNA 序列克隆与分析. 水产科学, 27(10): 519—522
 孙世春, 1994. 中国单针类纽虫一新记录. 青岛海洋大学学报, 24(3): 436—438
 吴 斌, 孙世春, 2007. 温度和手术对扁额细首纽虫渗透压调节的影响. 中国海洋大学学报, 37(2): 222—228
 秦玉明, 苏秀榕, 李 晔等, 2010. 缢蛏(*Sinonovacula constricta*)cDNA 文库的构建及肌动蛋白基因的研究. 海洋与湖沼, 41(1): 54—59
 倪晓光, 2007. 凝溶胶蛋白的结构和功能及其抑制肿瘤的作用. 实用癌症杂志, 22(1): 105—107
 韩晓曦, 王继红, 李庆伟, 2007. 凝溶胶蛋白的结构与功能. 中国生物化学与分子生物学报, 23(5): 331—337
 Chellaiah M, Kizer N, Silva M *et al*, 2000. Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength. *Journal of Cell Biology*, 148(4): 665—678
 Cunningham C C, Stossel T P, Kwiatkowski D J, 1991. Enhanced motility in NIH3T3 fibroblasts that overexpress gelsolin. *Science*, 251(4998): 1233—1236
 Ferjani I, Fattoum A, Maciver S K *et al*, 2006. A direct interaction with calponin inhibits the actin nucleating activity of gelsolin. *Biochem Journal*, 396(3): 461—468
 McGough A M, Staiger C J, Min J K *et al*, 2003. The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. *FEBS Letters*, 552(223): 75—81
 Silacci P, Mazzolai L, Gauci C *et al*, 2004. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(19220): 2614—2623
 Yin H L, Stossel T P, 1979. Control of cytoplasmic actin gelsolin transformation by gelsolin, a calcium dependent regulatory protein. *Nature*, 281(5732): 583—586
 Yukio Ohtsuka, Hiroki Nakae, Hiroshi Abe *et al*, 1998. Functional characteristic and the complete primary structure of ascidian gelsolin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1383(2): 219—231

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF GELSOLIN AND ACTIN OF *DENDRORHYNCHUS ZHEJIANGENSIS*

CHEN Lei¹, LI Ye¹, SU Xiu-Rong¹, JIANG Jin-Po², LI Tai-Wu^{1,2}, LI Zhen¹,
ZHOU Jun¹, LIU Yan¹, XIA Chang-Ge¹

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211;

2. Ningbo City College of Vocational Technology, Ningbo, 315100)

Abstract Gelsolin is a versatile actin binding protein, which can regulate actin filament remodeling in a Ca^{2+} -dependant way. In this study, the full length cDNA of gelsolin and actin gene were cloned using the cDNA library of *Dendrorhynchus zhejiangensis*. The full length cDNA of gelsolin gene was 1947bp with 62bp of 5'UTR, 778bp of 3'UTR, and 1107bp of ORF, which encodes 369 amino acids. The full length cDNA of actin gene was 1830bp with 167bp of 5'UTR, 532bp of 3'UTR, and 1131bp of ORF, which encodes 377 amino acids. The analysis of these sequences showed gelsolin gene included three gelsolin-like (G) domains which contained binding sites of Ca^{2+} , actin, and PIP_2 , respectively. Actin included binding sites of gelsolin, ATP, and profilin. The amino acids sequence of actin reached 94%—99% in similarity when aligned with actin proteins of other species. In addition, this study built the foundation for further research on the interaction mechanism between gelsolin and actin, and the mechanism of movement and regeneration of *D. zhejiangensis*.

Key words *Dendrorhynchus zhejiangensis*, Gelsolin, Actin, Gene cloning