

文章编号: 1674-5566(2011)02-0185-06

奥利亚罗非鱼 β -actin 基因的克隆与结构分析

胡海彦¹, 贾永义², 唐永凯¹

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081; 2. 浙江省淡水水产研究所, 浙江 湖州 313001)

摘要: β -actin 在真核细胞的生理过程中起着重要作用, 其序列具有高度保守性, 是一种管家基因。通过 RT-PCR 方法克隆出奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) β -actin 的部分 cDNA 序列, 其长度为 424 bp, 翻译成 138 个氨基酸, 计算的蛋白质分子量为 15.5 ku。氨基酸同源性分析显示, 奥利亚罗非鱼 β -actin 与真鲷 (*Pagrus major*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、龙溪鲮 (*Rivulus marmoratus*) 的相似性最高, 为 99.3%; 与鲫 (*Carassius auratus*)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 等其它鱼的相似性也较高, 为 97.8%~98.6%。此外, 还克隆出了奥利亚罗非鱼 β -actin 相应的 DNA 序列, 共 619 bp。cDNA 和 DNA 的序列比对显示克隆出的奥利亚罗非鱼 β -actin 含有 2 个内含子, 这为将来设计 β -actin 荧光定量 PCR 引物以及测定其在不同组织中的表达量变化打下基础。

研究亮点: β -actin 表达量恒定, 而且表达量高, 因此常用作管家基因。通过同源克隆的方法从奥利亚罗非鱼中克隆出 β -actin, 该方法简便易行, 成功率高; 克隆的奥利亚罗非鱼 β -actin 具有两个内含子, 这为设计定量 PCR 的内标引物提供了较多选择。

关键词: 奥利亚罗非鱼; β -actin; 克隆

中图分类号: S 917

文献标识码: A

在 RT-PCR 中, 目标基因的相对表达量通常是通过管家基因的均一化来确定。理想的管家基因应该是它的表达量不随样品以及实验处理的变化而变化^[1]。大量的研究表明, 目前还没有一种通用的管家基因符合这一条件, 最好的选择就是管家基因表达量在自己所研究的各组织中变化较小^[2-5]。肌动蛋白是构成细胞骨架和肌小节的主要成分, 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 42 ku 左右。根据等电点的不同, 高等动物细胞内的肌动蛋白可分为 α 、 β 、 γ 三类^[6]。 β -actin 基因氨基酸系列在不同的动物中高度保守, 其表达量恒定, 几乎不随生长的变化而变化, 而且表达量高, 因此常用作管家基因^[7-10]。本文通过克隆奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) β -actin 的 cDNA 和 DNA 序列, 分析其基因结构, 找出内含子, 为将来设计 β -actin 的荧光定量 PCR 引物以及测定其在

不同组织中的表达量变化打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼

奥利亚罗非鱼 (400 g 左右) 取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴实验基地。

1.1.2 试剂

Trizol Reagent 购自 Promega; AMV、Taq 酶、胶回收试剂盒、pUCm-T 载体、连接酶等购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 大肠杆菌 JM109 为本实验室保存。

1.1.3 仪器

PCR 仪为 Eppendorf Mastercycler personal。

1.1.4 引物

根据莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) β -actin 基因的 cDNA 序列 (GenBank

收稿日期: 2010-06-10 修回日期: 2010-12-29

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (nycytx-49); 基本科研业务费专项资金 (2011JBFC09)

作者简介: 胡海彦 (1976-), 男, 助理研究员, 主要从事生态养殖技术方面的研究。E-mail: huyh@ffrc.cn

通讯作者: 唐永凯, E-mail: tangyk@ffrc.cn

number: AB037865)以及尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*, GenBank number: AY116536)、鲢鱼(*Rhodeus notatus*, GenBank number: AF302045) β -actin的核 DNA 序列,设计能扩增出内含子的一对引物,其序列为: P₁: 5'-AGA AGA GTT ACG AGC TGC CTG ACG G-3'; P₂: 5'-TCT GTT TAG AAG CAC TTG CG GTG G-3'。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的抽提

取样本鱼肝脏,用 Trizol 裂解法抽提总 RNA,用变性琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色显示 28S rRNA 和 18S rRNA,检测 RNA 的完整性。

1.2.2 cDNA 部分序列的分离

取 5 μ g 抽提的总 RNA,以 OligodT-AP[5'-CTG ATC TAG AGG TAC CGG ATC C(T)₁₆-3']为引物,根据 AMV 使用说明进行 RT 反应,然后用 10% 的 RT 液,使用引物 P₁ 和 P₂ 扩增 β -actin 400 bp 左右的序列。PCR 反应体系为 25 μ L,其中含 2.5 μ L 10 \times buffer, 2 μ mol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTP, 引物各 0.1 μ mol/L, 0.125 U Taq 酶。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 3 min; 然后 30 循环, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 DNA 部分序列的分离

从鱼尾静脉抽血 0.2 ~ 0.5 mL,用经典的酚-仿法抽提 DNA^[11],以引物 P₁、P₂ 进行扩增,PCR 反应体系及反应条件同 1.2.2。

1.2.4 PCR 产物的连接与转化

扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离,切下琼脂糖胶上目的条带,用胶回收试剂盒纯化 PCR 产物,连接产物转化到大肠杆菌 JM109 的感受态细胞后,涂布于含 IPTG 和 X-Gal 的 LB 固体培养基(AMP⁺)。挑白斑,抽提质粒。经 EcoR I 和 Hind III 双酶切鉴定,并以质粒为模板进行 PCR 产物扩增再鉴定。

1.2.5 测序和序列分析

PCR 产物克隆到 pUCm-T 载体后,送上海捷瑞生物工程有限公司测序。用 Dnastar, Clustal W, Mega 软件分析奥利亚罗非鱼 β -actin 序列。

2 结果

2.1 奥利亚罗非鱼 β -actin 的分离

取总 RNA,经 RT-PCR 反应,用引物 P₁ 和 P₂

扩增得到 400 bp 左右的条带(图 1-A),经克隆后测序,片段大小为 424 bp。取提取的核 DNA,用引物 P₁ 和 P₂ 扩增得到 619 bp 片段(图 1-B)。

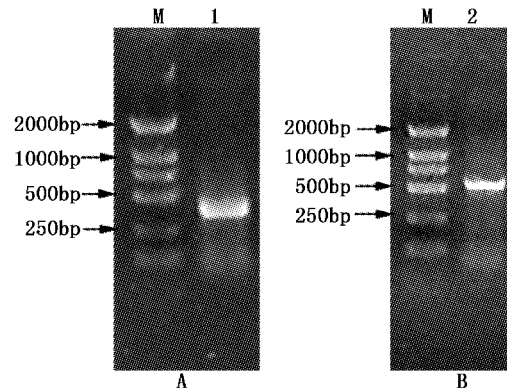


图 1 奥利亚罗非鱼 β -actin 基因的 PCR 扩增产物图

Fig. 1 The results of PCR amplification of β -actin gene in *O. aureus*

M. DL2000 DNA 分子量标准; 1. 以 cDNA 为模板扩增条带; 2. 以 DNA 为模板扩增条带。

2.2 序列拼接与分析

将奥利亚罗非鱼 β -actin 的 cDNA 和 DNA 序列提交到 GenBank,两条序列的登陆号分别为 EU784813、EU784812。其中 cDNA 编码 138 个氨基酸,预测的蛋白质分子量为 15.5 ku,理论等电点(pI)为 7.11,含疏水氨基酸 41 个,极性氨基酸 41 个,酸性氨基酸 15 个,碱性氨基酸 15 个。cDNA 和 DNA 的序列比对显示奥利亚罗非鱼 β -actin 含有 2 个内含子,而且内含子的 5' 端为 GT,3' 端为 AG,符合真核生物基因的剪接位点 GT-AG 规律(图 2)。

选取 GenBank 中已登录的一些动物的 β -actin 氨基酸序列: 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*, TRU37499)、莫桑比克罗非鱼(AB037865)、龙溪鲮(*Rivulus marmoratus*, AF168615)、黄鲮(*Monopterus albus*, AY647143)、金鲈(*Perca flavescens*, AY332493)、青鲮(*Oryzias latipes*, S74868)、欧洲鲮(*Platichthys flesus*, AF135499)、斑马鱼(*Danio rerio*, AF057040)、鲫(*Carassius auratus*, AB039726)、奥利亚罗非鱼(EU784812)、真鲷(*Pagrus major*, AB199890)。使用 Clustal W 软件^[12]与奥利亚罗非鱼 β -actin 氨基酸序列进行比对(图 3),发现这段氨基酸序列高度保守,在不同种类的鱼中只有 3 处位点存在差异。

```

1AG AAG AGT TAC GAG CTG CCT GAC GGA CAG GTC ATC ACC ATT GGG AAT GAG AGG TTC CGT TGC 424
  1 K  S  Y  E  L  P  D  G  Q  V  I  T  I  G  N  E  R  F  R  C  20
63 CCA GAG GCT CTC TTC CAG CCC TCA TTC CTC G gtaagcagcagctttaagacaggtttctgogatttg
  taaaagtagtccttaggggttaagggttgcccttgctaactttccaactctccacag
  GT ATG GAG TCT TGT GGT ATC CAT GAA ACT 424
21 P  E  A  L  F  Q  P  S  F  L  G  M  E  S  C  G  I  H  E  T  40
123 ACC TTT AAC AGC ATC ATG AAG TGT GAC GTT GAC ATC CGT AAG GAC TTG TAC GCC AAC ACT 424
  41 T  F  N  S  I  M  K  C  D  V  D  I  R  K  D  L  Y  A  N  T  60
183 GTG CTG TCT GGA GGT ACC ACC ATG TAC CCT GGC ATT GCT GAC CGC ATG CAG AAG GAG ATC 424
  61 V  L  S  G  G  T  T  M  Y  P  G  I  A  D  R  M  Q  K  E  I  80
243 ACT TCC CTG GCA CCC ACC ACC ATG AAG ATC AAG gtaaaattctgttactcaatctccgtctgtgat
  ttttttttttttttaaatgtggactgtagtcattgctgacaactctacttctctgccccttgag
  ATT ATT GCT CCC CCA GAG AGG AAG TAC 424
81 T  S  L  A  P  T  T  M  K  I  K  I  I  A  P  P  E  R  K  Y  100
303 TCT GTA TGG ATT GGA GGC TCC ATC CTG GCT TCT CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG TGG ATC 424
  101 S  V  W  I  G  G  S  I  L  A  S  L  S  T  F  Q  Q  M  W  I  120
363 AGC AAG CAG GAG TAC GAT GAG TCC GGC CCC AGC ATT GTC CAC CGC AAG TGC TTC TAA ACA 424
  121 S  K  Q  E  Y  D  E  S  G  P  S  I  V  H  R  K  C  F  *  138
423 GA 424

```

图2 奥利亚罗非鱼 β -actin 基因及其推导的氨基酸序列

Fig. 2 The DNA and deduced amino acid sequences of β -actin gene in *O. aureus*

大写字母表示外显子序列;小写字母表示内含子序列;内含子,外显子交接处用黑体表示;*代表终止密码子。

序列相似性比较结果显示,奥利亚罗非鱼 β -actin 基因氨基酸序列与真鲷、斑马鱼、青鳉、龙溪鳉的相似性最高,为 99.3%,与其它鱼的相似性也较高,为 97.8%~98.6% (图 4)。

3 讨论

β -actin 基因几乎在所有真核细胞中表达,是细胞骨架的主要组成成份。此基因广泛存在于动物的组织或细胞中,在不同的物种中具有高度保守性。本文克隆出的奥利亚罗非鱼部分 β -actin 编码氨基酸序列与真鲷、斑马鱼、青鳉、龙溪鳉的相似性最高,为 99.3%,与其它鱼的相似性也较高,为 97.8%~98.6%,这显示出了 β -actin 在鱼类中的高度保守性,在进行 β -actin 基因克隆时,可以采用同源克隆的方法。这也与张殿昌等研

究鲮 β -actin 的结果相似^[13]。鲮与其他鱼类 β -actin 基因编码区核苷酸序列同源性在 85.9%~99.6%。 β -actin 的这种高度的进化保守性可以作为研究物种间系统发育的良好对象,在研究物种间亲缘关系方面很有价值^[14-15]。

在提取的 RNA 样品中,不可避免的会残留少量的 DNA,同样会作为模板在 RT-PCR 中扩增,这必然会影响到实验结果的准确性。为了去除 DNA 的污染,通常需要将 RNA 进行 DNase 酶处理,但这也同时增加了样品被污染的机率。最直接的方法就是通过设计跨越内含子的引物来消除 DNA 的污染,使大片的 DNA 不能被扩增^[16]。本文克隆出的 β -actin 基因正好含有内含子,这无疑为将来设计管家基因 β -actin 的引物提供了可靠的基础数据。

红鳍东方鲀	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDL YANT
莫桑比克罗非鱼	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDL YANT
龙溪鳉	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDL YANT
黄鳊	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDL YANT
金鲈	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDL YANT
青鳉	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDL YANT
欧洲鳊	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDL YANT
斑马鱼	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRKDL YANT
鲫	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRKDL YANT
奥利亚罗非鱼	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRKDL YANT
真鲷	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRKDL YANT
	*****:*****
红鳍东方鲀	VLSGGTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI
莫桑比克罗非鱼	VLSGGTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI
龙溪鳉	VLSGGTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI
黄鳊	VLSGGTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI
金鲈	VLSGGTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI
青鳉	VLSGGTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI
欧洲鳊	VLSGGTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI
斑马鱼	VLSGGTMYPGIADRMQKEITSLAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI
鲫	VLSGGTMYPGIADRMQKEITSLAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI
奥利亚罗非鱼	VLSGGTMYPGIADRMQKEITSLAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI
真鲷	VLSGGTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI
	*****:***:*****
红鳍东方鲀	SKQEYDESGPSIVHRKCF
莫桑比克罗非鱼	SKQEYDESGPSIVHRKCF
龙溪鳉	SKQEYDESGPSIVHRKCF
黄鳊	SKQEYDESGPSIVHRKCF
金鲈	SKQEYDESGPSIVHRKCF
青鳉	SKQEYDESGPSIVHRKCF
欧洲鳊	SKQEYDESGPSIVHRKCF
斑马鱼	SKQEYDESGPSIVHRKCF
鲫	SKQEYDESGPSIVHRKCF
奥利亚罗非鱼	SKQEYDESGPSIVHRKCF
真鲷	SKQEYDESGPSIVHRKCF

图3 奥利亚罗非鱼与其他鱼类 β -actin 氨基酸序列的比较

Fig. 3 Alignment result of amino acid sequence of β -actin in *O. aureus* and other fishes
相同和相似氨基酸分别以星号和点表示。

		一致性												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
分歧	1	■	98.6	99.3	99.3	97.8	99.3	97.8	99.3	97.8	97.8	97.8	奥利亚罗非鱼	
	2	1.5	■	93.3	97.8	97.8	97.8	97.8	97.8	97.8	97.8	97.8	鲫鱼	
	3	0.7	0.7	■	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	斑马鱼	
	4	0.7	2.2	1.5	■	98.6	100	98.6	100	98.6	98.6	98.6	龙溪鱒	
	5	2.2	2.2	1.5	1.5	■	98.6	100	98.6	100	100	100	金鲈	
	6	0.7	2.2	1.5	0.0	1.5	■	98.6	100	98.6	98.6	98.6	青鳉	
	7	2.2	2.2	1.5	1.5	0.0	1.5	■	98.6	100	100	100	莫桑比克罗非鱼	
	8	0.7	2.2	1.5	0.0	1.5	0.0	1.5	■	98.6	98.6	98.6	真鲷	
	9	2.2	2.2	1.5	1.5	0.0	1.5	0.0	1.5	■	100	100	9	欧洲鳊
	10	2.2	2.2	1.5	1.5	0.0	1.5	0.0	1.5	0.0	■	100	10	黄鳊
	11	2.2	2.2	1.5	1.5	0.0	1.5	0.0	1.5	0.0	0.0	■	11	红鳍东方鲀
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		

图 4 序列相似性分析

Fig. 4 The comparison analysis of sequence similarity

参考文献:

- [1] RADONIC A, THULKE S, MACKAY I M, *et al.* Guideline to reference gene selection for quantitative real time PCR[J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2004, 313(4): 856-862.
- [2] HEDA K, HUGGETT J F, BUSTIN S A, *et al.* Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR[J]. *Biotechniques*, 2004, 37(1): 112-119.
- [3] PFAFFL M W, TICHOPAD A, PRGOMET C, *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differently regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations [J]. *Biotechnol Letters*, 2004, 26(6): 509-515.
- [4] HUGGETT J, DHEDA K, BUSTIN S, *et al.* Real-time RT-PCR normalization: strategies and considerations[J]. *Genes Immun*, 2005, 6(4): 279-284.
- [5] 周瑞雪, 蒙涛, 赵发兰, 等. 草鱼 MYH mRNA 表达量分析中采用的内参基因稳定性比较[J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(5): 896-900.
- [6] VENKATESH B, TAY B H, ELGAR G, *et al.* Isolation, characterization and evolution of nine pufferfish (*fugu rubripes*) actin genes [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 259(4): 655-665.
- [7] 夏来新, 程汉华, 郭一清, 等. 黄鳊 β -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.* House-keeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(421): 2907-2914.
- [9] GLARE E M, DIVJAK M, BAILEY M J, *et al.* Beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels[J]. *Thorax*, 2002, 57(9): 754-6.
- [10] 段晶晶, 李霞, 周伯文, 等. 仿刺参 β -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] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual* [M]. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [12] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [13] 张殿昌, 江世贵, 邵艳卿, 等. 鲢肌动蛋白基因的分子克隆及其作为分子内标的可靠性分析[J]. *中国水产科学*, 2006, 13(5): 708-713.
- [14] LEE J S, LEE S H, GYE M C, *et al.* The beta-actin gene of two species of southern top mouth minnow (*Pseudorasbora parva*) and the common fat minnow (*Rhynchocypris oxycephalus*) from the family Cyprinidae [J]. *DNA Sequence*, 2001, 11(3-4): 301-307.
- [15] HWANG U W, HAN M S, KIM I C, *et al.* Cloning and sequences of beta-actin genes from *Rhodeus notatus* and the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (cyprinidae) and the phylogeny of Cyprinid fishes inferred from beta-actin genes [J]. *DNA Sequence*, 2022, 13(3): 153-159.
- [16] DYAN S, KATHLEEN S, FREDERICK W, *et al.* Sensitivity of housekeeping genes in the hypothalamus to mismatch in diets between pre- and postnatal periods in mice [J]. *Neuroscience Letters*, 2008, 47(1): 54-57.

Cloning and gene construction analysis of β -actin in *Oreochromis aureus*

HU Hai-yan¹, JIA Yong-yi², TANG Yong-kai¹

(1. Key Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

Abstract: Eukaryotic β -actin gene plays an important role in physiological process and its sequence is highly conservative as a housekeeping gene. The partial cDNA encoding β -actin in *Oreochromis aureus* was isolated using RT-PCR. The cDNA isolated was 424 bp encoding 138 amino acids with a calculated molecular weight of 15.5 ku. The comparison analysis of the deduced amino acid sequence of β -actin in *O. aureus* showed high similarity of 99.3% with those of *Pagrus major*, *Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Rivulus marmoratus*, and 97.8% – 98.6% homology with those of other fishes, such as *Carassius auratus*, *Takifugu rubripes*. The corresponding DNA sequence of *O. aureus* β -actin in size of 619 bp was also cloned. By comparing the sequences of cDNA and DNA, it was found that β -actin gene in *O. aureus* consisted of two introns. The present study provided some useful information in designing the β -actin primers for real time RT-PCR and evaluating the β -actin expression level for different tissues.

Key words: *Oreochromis aureus*; β -actin; cloning