

文章编号: 1674-5566(2013)05-0678-06

稀有鮡鲫卵黄蛋白原基因全序列的克隆与分析

黄婷妹, 蔡生力, 刘红

(上海海洋大学 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 201306)

摘要: 稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)是我国特有的一种小型鲤科鱼类,目前已作为一种新型模式生物应用于实验研究。运用普通PCR方法克隆得到一段长6 299 bp的序列,序列分析发现编码区与稀有鮡鲫卵黄蛋白原cDNA序列相似性为100%。再参考6 299 bp序列5'端设计两对特异性引物,进行基因组步移,获得长度为1 285 bp的序列。经过序列拼接后得到7 573 bp的序列,分析发现其中含卵黄蛋白原基因全序列长度为6 595 bp,卵黄蛋白原基因上游调控序列长度为978 bp。进一步分析开放性阅读框得知:稀有鮡鲫卵黄蛋白原基因含有26个外显子和25个内含子,编码1 299个氨基酸序列,CDS长3 900 bp。经BLAST比对发现,稀有鮡鲫卵黄蛋白原上游调控序列中220~838 bp区间与朝鲜鲮(*Acheilognathus yamatsutae*)卵黄蛋白原基因启动子序列2 857~3 469 bp区间有80%相似性。

研究亮点: 有关稀有鮡鲫的研究虽然已有不少积累,然而对于该种类的卵黄蛋白原的结构、功能、合成过程和机理等方面的研究仍是空白,本文以稀有鮡鲫为研究对象,通过基因组步移技术克隆得到卵黄蛋白原的基因全序列并分析预测其功能为丰富鱼类繁殖发育生物学,进一步探索稀有鮡鲫这一具有重要研究价值的鱼类提供科学依据。

关键词: 卵黄蛋白原; 稀有鮡鲫; 基因组步移; 序列分析

中图分类号: S 917

文献标志码: A

稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)是我国特有的一种小型鲤科鱼类,属鲤形目,鲤科,丹亚科,鮡鲫属,俗称金白娘、墨线鱼。目前该种类已作为一种新型模式生物应用于实验研究,研究内容涉及鱼病学^[1]、遗传学^[2-5]、环境科学^[6]、胚胎学^[7]、生理生态学^[8]等领域。从不同种属的鱼中分离得到的Vg在脂化、糖基化和磷酸化的程度上存在差别,由这种差别所引起的功能的不同目前还不清楚。本实验旨在克隆得到稀有鮡鲫卵黄蛋白原基因全序列及其上游调控序列,并根据所得基因序列预测卵黄蛋白原的结构及功能,为鱼类繁殖生物学提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用的稀有鮡鲫由中国科学院水生生物研究所惠赠,本实验室长期饲养保存。

1.2 主要试剂

主要试剂包括海洋动物基因组DNA提取试剂盒、200 bp Marker、Marker II、胶回收试剂盒(Agarose Gel DNA purification kit ver 2.0)、pMD19-T vector、氯化钠(NaCl)、胰蛋白胨(Tryptone)、酵母提取物(Yeast Extract)、氨苄青霉素钠(Ampicillin Sodium)、琼脂粉(Agar)、IPTG、X-gal(购自天根生化科技有限公司)、LA Taq酶购自TaKaRa公司。

1.3 基因组DNA的提取与检测

取稀有鮡鲫肌肉组织30 mg,按照天根生化的海洋动物基因组DNA提取试剂盒步骤进行基因组DNA的提取。1%的琼脂糖凝胶电泳检测其纯度,-20℃保存备用。

1.4 引物设计与合成

根据NCBI上已公布的稀有鮡鲫卵黄蛋白原cDNA全序列设计3对引物,V、H和Q(表1),引

收稿日期: 2013-04-07 修回日期: 2013-05-23

基金项目: 上海市教育委员会重点学科建设项目(J50701);上海市教育委员会创新项目(12YZ125)

作者简介: 黄婷妹(1989—),女,硕士研究生,研究方向为水产动物养殖与发育生物学。E-mail: htm112@yeah.net

通信作者: 刘红, E-mail: hliu@shou.edu.cn

物由上海桑尼生物科技有限公司合成,稀释成 10 $\mu\text{mol/L}$ 备用。

1.5 PCR 扩增

PCR 反应总体积为 50 μL , 包括:去离子水 22 μL , 2 \times Taq PCR mastermix 25 μL , 模板 DNA 1 μL , 上下游引物各 1 μL 。反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 退火 2 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。引物 V 和 H 及 Q 退火温度分别是 65.0 $^{\circ}\text{C}$ 、60.8 $^{\circ}\text{C}$ 、62.0 $^{\circ}\text{C}$ 。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 克隆与测序

PCR 扩增产物经胶回收试剂盒 (Agarose Gel DNA purification kit ver 2.0) 纯化回收后, 与 pMD19-T 载体 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。连接产物转入感受态大肠杆菌 DH5 α 中, 蓝白斑筛选重组子。筛选所得菌液经 PCR 鉴定后委托麦浦生物有限公司进行测序。测序结果用 Seqman 软件进行序列拼接; 拼接结果用 BLAST 软件进行同源性比对。

1.7 构建基因组步移文库

用 4 种平末端限制性内切酶 *Eco* R V、*Dra* I、*Stu* I 和 *Pvu* II 消化稀有鮰鲫基因组 DNA。按照 Clontech 基因组步移文库说明书构建文库 E、D、S、P。

1.8 基因组步移

根据 1.6 中获得的序列设计两组特异性引物 (GSP1: 5'-GTGAGCTTACTGGCAGGAACAAATGGA-3', GSP2: 5'-TTTATACCTGCTCTAGCCAGACCTTCT-3'), 见表 1, 利用基因组步移技术对目的基因的 5' 端进行 PCR 扩增。一次 PCR 分别以构建的文库 D、E、P、S 为模板, 利用接头引物 AP1 与 GSP1 进行 PCR 扩增, 反应条件: (94 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min) \times 7; (94 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 67 $^{\circ}\text{C}$ 3 min) \times 32; 67 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。二次 PCR 以一次 PCR 获得的产物为模板, 利用接头引物 AP2 与 GSP2 进行 PCR 扩增, (94 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min) \times 5; (94 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 67 $^{\circ}\text{C}$ 3 min) \times 20; 67 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。

PCR 扩增产物经纯化回收后, 与 pMD19-T 载体 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。连接产物转入感受态大肠杆菌 DH5 α 中, 蓝白斑筛选重组子。筛选所得菌液经 PCR 鉴定后委托麦浦生物有限公司进行测序。

1.9 序列分析

测序结果用 Seqman 软件进行序列拼接, 拼

接结果用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 软件进行同源性比对; 利用 GEECEE 软件进行 GC 含量分析; 利用 Gene mark 分析预测核苷酸序列开放读码框, 利用 GenScan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) 预测外显子及内含子的拼接位点; 利用 Match1.0 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html#match>) 对上游调控元件进行预测。

表 1 克隆稀有鮰鲫卵黄蛋白原基因全序列所用的引物
Tab.1 Oligonucleotide primer sequences used in amplification of vitellogenin gene of *Gobiocypris rarus*

引物名称	引物序列(5'-3')	产物预计大小/kb
V	F:GTACGCTAATGGTCTGGTTGAAAG R:CGGATCTTTCCTCTTGCCATAACA	3.8
H	F:GAACACTGCCITCATCCA R:AGCTCACATTGCGTCTCTG	2.2
Q	F:AGTTCATAGATGTTCTGGGT R:TCAGGCTCTGCTCTTGGG	0.5

2 结果与分析

2.1 卵黄蛋白原基因全序列及其上游调控序列的克隆

以引物 V、H 和 Q, 稀有鮰鲫基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 结果如图 1(a) 所示, 得到 3 条特异性的片段, 与预期结果相符。经过测序后确定 3 条序列分别为 3 747 bp、2 360 bp 和 482 bp。经过 Seqman 软件进行序列拼接后得到一条 6 299 bp 的序列。在基因组步移实验中, 以 GSP-1 和 AP1、GSP-2 和 AP2 为引物, 文库 P、S、D、E 为模板进行巢式 PCR 扩增, 结果如图 1(b) 所示, 获得两条片段, 分别约为 1.2 kb 和 0.6 kb。经回收测序分析后, 得到 1 285 bp 的 DNA 序列。再与前面所得序列经过拼接后得到一条 7 573 bp 的序列, 进一步分析发现: 该序列中包含卵黄蛋白原基因序列长度为 6 595 bp 和上游调控序列长度为 978 bp。同时发现, 卵黄蛋白原基因序列中 5' 端有 ATG 起始密码, 3' 端有 TAG 终止密码子, 可以确定长度为 6 595 bp, 序列为卵黄蛋白原基因全序列。

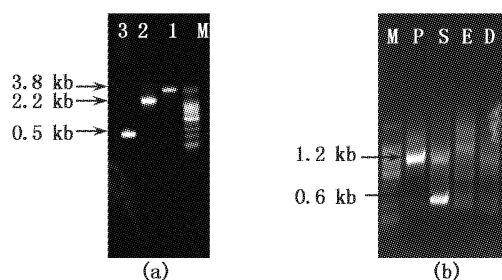


图 1 稀有鮎鲫卵黄蛋白原基因全长克隆结果及 5'上游侧翼序列基因组步移结果

Fig.1 The amplification products of vitellogenin DNA gene (a) and the PCR results of 5'-flanking sequence genome walking (b) of *Gobiocypris rarus*

M 表示 200 bp marker;图(a)中泳道 1、2、3 分别表示引物 V、H、Q 扩增得到的片段;图(b)中泳道 P、S、E、D 分别表示 *Pvu* II, *Stu* II, *Eco*R V 和 *Dra* I 文库的 PCR 扩增产物。

2.2 稀有鮎鲫卵黄蛋白原基因开放性阅读框的分析

将克隆得到的序列提交至 NCBI (提交号: 1631855), 对其进行开放性阅读框分析, 发现稀有鮎鲫卵黄蛋白原共有 26 个外显子和 25 个内含

子, 共编码 1 299 个氨基酸, CDS 长 3 900 bp。本实验中所获得的稀有鮎鲫卵黄蛋白原 cDNA 序列与 NCBI 网站上已公布的序列间相似度为 100%。

2.3 稀有鮎鲫卵黄蛋白原基因序列的比较分析

将分析所得的稀有鮎鲫卵黄蛋白原基因编码区序列进行 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 同源性分析, 结果发现: 所得的序列与斑马鱼、鲮、喀拉鲃、唐鱼、锦鲤卵黄蛋白原基因 cDNA 序列的相似性在 63% ~ 89% 之间; 经预测得到的稀有鮎鲫卵黄蛋白原氨基酸序列与斑马鱼、鲮、喀拉鲃、唐鱼、锦鲤卵黄蛋白原氨基酸序列之间的相似性在 70% ~ 91% 之间, 具体结果如表 2 所示。

2.4 稀有鮎鲫卵黄蛋白原基因上游调控序列分析

利用 Match 1.0 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html#match>) 对稀有鮎鲫卵黄蛋白原基因上游调控元件进行预测分析, 得到结果如表 3 所示。

表 2 稀有鮎鲫卵黄蛋白原 cDNA 与氨基酸序列与其他鱼类比对结果

Tab.2 The comparison results of cDNA and amino acid sequences of vitellogenin gene among *Gobiocypris rarus* and other kinds of fish

	cDNA 长度/bp	cDNA 序列相似性	氨基酸序列长(aa)	氨基酸序列相似性
斑马鱼 (<i>Danio rerio</i>)	4 256	69% (2 929/4 212)	1 358	70% (993/1 299)
鲮 (<i>Cirrhinus molitorella</i>)	4 187	88% (3 688/4 212)	1 342	85% (1 146/1 344)
喀拉鲃 (<i>Catla catla</i>)	4 195	87% (3 651/4 212)	1 339	91% (1 226/1 343)
锦鲤 (<i>Cyprinus carpiod</i>)	4 098	70% (2 955/4 212)	1 624	88% (1 203/1 355)
肥头鲮鱼 (<i>Pimephales promelas</i>)	4 020	89% (3 755/4 212)	1 399	91% (1 232/1 348)
尖头鲮 (<i>Phoxinus oxycephalus</i>)	4 035	87% (3 672/4 212)	1 344	88% (1 196/1 350)
金鱼 (<i>Carassius auratus</i>)	4 139	69% (2 889/4 212)	1 348	76% (989/1 299)
朝鲜鲮 (<i>Acheilognathus yamatsutae</i>)	5 010	68% (2 871/4 212)	1 550	72% (936/1 299)
唐鱼 (<i>Tanichthys albonubes</i>)	4 171	63% (2 646/4 212)	1 326	82% (1 132/1 366)

表 3 稀有鮎鲫卵黄蛋白原基因上游序列调控元件预测结果

Tab.3 The prediction of transcriptional factor binding sites of vitellogenin gene of *Gobiocypris rarus*

位置	核心相关度	矩阵相关度	序列	调控元件
577 (+)	0.772	0.832	ATATATGATAGAATA	Evi-1
751 (+)	1.000	0.955	AGTTAATAATTAATT	HNF-1
751 (+)	1.000	0.873	AGTTAATAATTAATTTT	HNF-1
770 (+)	1.000	0.942	AAAATAATACTTGG	FOXJ2
774 (-)	1.000	0.911	TAATACTTGGTCAGCAATA	V-MAF

将上游调控序列进行 BLAST 同源性分析, 发现稀有鮎鲫卵黄蛋白原基因上游调控序列中 220 ~ 838 bp 区间与朝鲜鲮 (*Acheilognathus yamatsutae*)

卵黄蛋白原基因启动子序列 (GenBank 登录号为 GQ332567.1) 2 857 ~ 3 469 bp 区间有 80% 相似性, 都有 3 个相同的基因调控位点, 分别为 HNF-

1、FOXJ2、V-MAF。另外朝鲜鳎(*Acheilognathus yamatsutae*)卵黄蛋白原基因启动子序列 2 857 ~ 3 469 bp 区间另有 FOXD3、BR-C Z1 两个特异性调控因子结合位点。

2.5 稀有鮟鲫卵黄蛋白原基因与斑马鱼卵黄蛋白原基因的比较分析

将克隆得到的稀有鮟鲫卵黄蛋白原基因序列进行开放性阅读框分析,发现稀有鮟鲫卵黄蛋白原基因全长 6 595 bp,有 26 个外显子和 25 个内含子;在 NCBI 网站上查找得到斑马鱼卵黄蛋白原基因序列全长为 7 001 bp,同样进行开放阅读框分析,发现斑马鱼卵黄蛋白原共有 25 个外显子和 24 个内含子,斑马鱼的卵黄蛋白原基因与稀有鮟鲫卵黄蛋白原基因序列相差 406 bp 片段。

对稀有鮟鲫卵黄蛋白原基因外显子与斑马鱼卵黄蛋白原基因外显子进行比较,结果如表 4 所示:与斑马鱼相比,稀有鮟鲫卵黄蛋白原中插入了一段序列,长度为 21 bp,位于第 1 外显子和第 3 外显子之间,可能导致 7 个氨基酸序列的插入;另外,稀有鮟鲫卵黄蛋白原第 22 个外显子(252 bp)比斑马鱼卵黄蛋白原第 21 个外显子(312 bp)少了一段 60 bp 的序列。除此以外,两者外显子的数量、位置及大小均极为相似。将稀有鮟鲫和斑马鱼卵黄蛋白原基因序列均去除内含子,分别得到 4 212 bp(稀有鮟鲫)和 4 256 bp(斑马鱼)的卵黄蛋白原基因编码区,两者比较后发现相似性为 69%;将稀有鮟鲫和斑马鱼的内含子序列进行比较分析后发现,二者无相似性部分。

表 4 稀有鮟鲫卵黄蛋白原基因外显子与斑马鱼卵黄蛋白原基因外显子和内含子比较结果

Tab.4 The comparison results of the exons and introns of vitellogenin gene between *Gobiocypris rarus* and zebra fish

外显子代号	稀有鮟鲫卵黄蛋白原外显子位置与长度/bp	斑马鱼卵黄蛋白原外显子位置与长度/bp	稀有鮟鲫卵黄蛋白原内含子长度/bp	斑马鱼卵黄蛋白原内含子长度/bp
1	846 - 884(39)	15 - 53(39)	133	204
2	1018 - 1038(21)	258 - 410(153)	127	75
3	1166 - 1318(153)	486 - 747(252)	122	74
4	1441 - 1692(252)	822 - 983(162)	98	92
5	1791 - 1952(162)	1076 - 1225(150)	88	111
6	2041 - 2190(150)	1337 - 1486(150)	63	77
7	2254 - 2413(150)	1564 - 1719(156)	97	83
8	2511 - 2666(156)	1803 - 1967(165)	81	104
9	2748 - 2912(165)	2072 - 2194(123)	104	86
10	3017 - 3139(123)	2281 - 2499(219)	84	136
11	3224 - 3442(219)	2586 - 2804(219)	102	114
12	3545 - 3763(219)	2919 - 3017(99)	87	128
13	3851 - 3949(99)	3146 - 3258(123)	113	101
14	4063 - 4185(123)	3360 - 3461(102)	77	96
15	4263 - 4374(102)	3558 - 3677(120)	86	109
16	4461 - 4580(120)	3787 - 3972(186)	108	91
17	4689 - 4874(186)	4064 - 4165(102)	88	89
18	4963 - 5064(102)	4255 - 4440(186)	84	81
19	5149 - 5334(186)	4522 - 4635(114)	111	95
20	5446 - 5559(114)	4731 - 4922(192)	85	78
21	5645 - 5836(192)	5001 - 5312(312)	76	734
22	5913 - 6164(252)	6047 - 6253(207)	401	74
23	6566 - 6772(207)	6328 - 6471(144)	78	94
24	6851 - 6994(144)	6566 - 6703(138)	89	83
25	7084 - 7222(138)	6787 - 6911(125)	85	
26	7308 - 7432(125)			

3 讨论

3.1 稀有鮟鲫卵黄蛋白原基因序列比较分析

经查阅发现,斑马鱼卵黄蛋白原基因编码

1 378个氨基酸序列。通过 BLAST 比对发现,稀有鮟鲫卵黄蛋白原氨基酸序列与斑马鱼氨基酸序列相似性为 70% (907/1299)。通过相似性氨基酸比对发现,稀有鮟鲫卵黄蛋白原氨基酸序列与斑马鱼卵黄蛋白原氨基酸序列的相似性为

76% (993/1299)。将斑马鱼、唐鱼、锦鲤等卵黄蛋白原氨基酸序列与稀有鮟鲫卵黄蛋白原氨基酸序列进行保守分析,发现在鱼类生物进化过程中,卵黄蛋白原氨基酸序列相对保守性较高。虽然卵黄蛋白原的结构在许多动物中具有一定的保守性和同源性,但一些研究发现卵黄蛋白原具有明显的种特异性,不同属的鱼类之间卵黄蛋白原和其他抗体很少发生交叉免疫反应^[9]。

在对稀有鮟鲫卵黄蛋白原基因序列分析后发现,在第 26 个外显子末端为 TAG 终止密码子,在 3'端后又发现有 AATAA 的多聚腺苷酸信号,基本可确定实验获得的序列为稀有鮟鲫卵黄蛋白原的全序列^[10-14]。

3.2 稀有鮟鲫卵黄蛋白原上游调控因子

在稀有鮟鲫卵黄蛋白原基因上游调控序列的分析中发现,其含有 Evi-1、HNF-1、FOXJ2、V-MAF 等调控元件。Evi-1 是于非洲爪蟾中发现的一种蛋白编码调控因子。在对造血干细胞^[15]和骨髓细胞性白血病^[16]研究中发现,Evi-1 是一个远端正调控因子,在鱼类肾组织下远端的表达中占据着相当重要的位置。由此我们可以推测出 Evi-1 可能对稀有鮟鲫卵黄蛋白原的表达有着正调控的作用。HNF-1 是一种发现于大西洋鲑中的蛋白编码调控因子,在对大西洋鲑 HNF-1 蛋白 cDNA 序列^[17]和胃癌基因^[18]等的研究过程中发现,HNF-1 调控因子并不是只存在于肝脏中,也存在肠、肾和脾中;鲑鱼 HNF-1 蛋白基因启动子含有 TATA 盒,并发现其上游序列中含有一个 HNF-1 调控因子结合位点;对 MUC5AC 粘蛋白的表达有监控作用。可以推测 HNF-1 属于一种重要的顺式监控元件,在稀有鮟鲫卵黄蛋白原表达中控制卵黄蛋白原序列的表达。

参考文献:

- [1] UTARABHAND P, BUNLIPATANON P. Plasma vitellogenin of grouper (*Epinephelus malabaricus*): Isolation and properties [J]. Compare Biochemistry Physiology, Part C: Pharmacol Toxicol Endocrinol, 1996, 115(2): 101 - 110.
- [2] VENUGOPAL K J, KTRNAR D. Vitellins and vitellogenins of *Dysdercus koenigii* (*Heteroptem Pyrrhocotidae*) identification, purification and temporal pattern [J]. Compare Biochemistry Physiology, Part B, 1999, 124: 215 - 223.
- [3] YOSHIKAZAKI M, ORIYAMA A, YONEZAWA S, et al. Purification and properties of embryonic cysteine proteinase which participates in yolklysis of *Xenopus laevis* [J]. Compare Biochemistry Physiology, Part B, 1998, 119: 571 - 576.
- [4] JANEIRO-CINQUINI T R, RIBOLLA P E, CAPURRO M, et al. Vitell- egenin and yolk protein processing in *Bothrops jararaca* (wied), a tropical venomous snake [J]. Compare Biochemistry Physiology, Part B, 1999, 122: 189 - 198.
- [5] 王铁辉, 刘沛霖, 陈宏溪, 等. 稀有鮟鲫对草鱼出血病毒敏感性的初步研究 [J]. 水生生物学报, 1994, 18(2): 144 - 149.
- [6] 贾方钧, 魏芸. 稀有鮟鲫的染色体核型初报 [J]. 水生生物学报, 2001, 25(4): 425 - 425.
- [7] 周永欣, 成水平, 胡炜, 等. 稀有鮟鲫——一种新的鱼类毒性试验材料 [J]. 动物学研究, 1995, 16(1): 59 - 63.
- [8] 彭扣, 王玉凤, 刘绪生, 等. 稀有鮟鲫 β -肌动蛋白基因片段的克隆及其同源性分析 [J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2006, 40(4): 580 - 584.
- [9] 叶斐菲, 刘红, 蔡生力, 等. 稀有鮟鲫 β -肌动蛋白启动子的克隆及其驱动活性的初步检测 [J]. 渔业科学进展, 2010, 31(2): 80 - 87.
- [10] 叶莹, 蔡生力, 刘红等. 基因组步移技术克隆稀有鮟鲫角蛋白 18 基因序列及序列分析 [J]. 上海海洋大学学报, 2009, 20(5): 661 - 668.
- [11] 王剑伟. 稀有鮟鲫的繁殖生物学 [J]. 水生生物学报, 1992, 16(2): 165 - 174.
- [12] 曹文宣, 王剑伟. 稀有鮟鲫——一种新的鱼类实验动物 [J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(s): 96 - 99.
- [13] WATTS M, PANKHURST W, PRYCE A, et al. Vitellogenin isolation, purification and antigenic cross-reactivity in the teleost species [J]. Compare Biochemistry Physiology, 2003, 134B: 467 - 476.
- [14] 生秀杰, 姜莉, 周伟强, 等. 应用基因组步移克隆小鼠 Doc-1R 基因组序列 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2001, 18(4): 314 - 316.
- [15] 朱志明, 陈晖, 李盛霖, 等. 半番鸭 POU1F1 基因序列的克隆与生物信息学分析 [J]. 福建畜牧兽医, 2010, 32(1): 1 - 4.
- [16] 卫正国, 陈玉华, 李兵, 等. 家蚕 P450 基因 CYP305B1 的基因组序列克隆及结构分析 [J]. 蚕业科学, 2009, 35(1): 144 - 147.
- [17] 孙玉英, 张继泉, 王淑军, 等. 基因组步移技术克隆芽孢杆菌 *Bacillus* sp. S-1 壳聚糖酶基因与序列分析 [J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(5): 72 - 77.
- [18] HIRAMATSU N, ICHIKAWA N, HARUHISA F, et al. Identification and characterization of proteases involved in specific proteolysis of vitellogenin and yolk proteins in salmonids [J]. Experiment Zoology, 2002, 292(1): 11 - 25.

Cloning and sequence analysis of full-length vitellogenin gene of *Gobiocypris rarus*

HUANG Ting-mei, CAI Sheng-li, LIU Hong

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certified by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Gobiocypris rarus* is a unique species of small fish in China. At present study, a fragment of 6 299 bp was cloned by PCR method. It was found that the sequence identity of coding area of this fragment is 100% compared to the cDNA sequence of vitellogenin of *Gobiocypris rarus*. By using genome walking technique, a product of 1 285 bp was acquired based on the 6 299 bp sequence. Finally, a sequence of 7 573 bp was gotten by comparing the two fragments of 1 285 bp and 6 299 bp, with a vitellogenin gene of 6 595 bp and upstream sequence of 978 bp. After the ORF analysis, it was found there were 26 exons and 25 introns, the CDS was 3 900 bp which code 1 200 amino acid. Blast analysis found there existed 80% sequence identity between the upstream fragment of 220 – 838 bp of our sequence and the promoter sequence of 2 875 – 3 469 bp of vitellogenin of *Acheilognathas yamatsutae*.

Key words: *Gobiocypris rarus*; genome walking; vitellogenin; sequence analysis

欢迎订阅 2014 年《水产学报》

《水产学报》是由中国科协主管、中国水产学会主办、科学出版社出版的以反映我国水产科学技术成果为主的学术类核心期刊(中国科学引文数据库 CSD 核心库和中国科学技术信息研究所核心库),中国科协“精品科技期刊示范项目”资助期刊,中信所“中国百种杰出学术期刊”。创刊于 1964 年,是中国水产科学研究领域历史最为悠久的刊物之一,是促进中国水产科学研究发展、加强国际间学术交流、展示中国水产科学领域最新科研成果与研究进展的重要平台。

本刊主要刊载水产基础研究、水产养殖和增殖、渔业水域环境保护、水产品保鲜加工与综合利用、渔业机械仪器等方面的论文和综述。月刊,每期 160 页,每期订价 49.00 元,全年订价 588.00 元。国内统一刊号:CN 31-1283/S,国际标准刊号:ISSN 1000-0615,国内邮发代号:4-297,国外发行代号:M-387。读者可在当地邮局办理订阅,破季、漏订或补订均可直接与编辑部联系。个人订户可享受 6 折优惠。

编辑部地址:上海市临港新城沪城环路 999 号 201 信箱(邮编:201306)

联系人:张美琼

电话:021-61900228,传真:021-61900227

E-mail:mqzhang@shou.edu.cn;jfc@shou.edu.cn

Website:www.scxuebao.cn