

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*

李继姬 郭宝英 吴常文

(浙江海洋学院海洋科学学院 浙江省海洋养殖装备与工程技术重点实验室 舟山 316004)

提要 采用 RT-PCR 和快速扩增 cDNA 末端(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术首次克隆了曼氏无针乌贼 β -肌动蛋白基因的 cDNA 全序列, 该序列全长为 2000bp, 由长 197bp 的 5'非翻译区(untranslated region, UTR), 669bp 的 3'非翻译区, 和 1134bp 的开放阅读框(open reading frame, ORF)组成。阅读框共编码 377 个氨基酸, 推算的分子量约为 42.0kDa, 理论等电点为 5.16。曼氏无针乌贼 β -actin 氨基酸序列中 Ile12、Ser172、Ser174、Gln223、His227、Ile231、Gly232、Ser320、Glu328、Thr360 等 10 个氨基酸残基具有特异性, 以及 2 个特殊的氨基酸残基位点和 2 个软体动物特有的氨基酸残基。曼氏无针乌贼 β -actin 氨基酸序列与软体动物、节肢动物、脊椎动物的相似性高达 97%。NJ 法系统进化分析显示曼氏无针乌贼首先与软体动物聚在一起, 然后与节肢动物聚在一起, 再与鱼类、两栖类、哺乳类聚在一起。

关键词 曼氏无针乌贼, cDNA, 快速扩增 cDNA 末端(RACE), β -肌动蛋白基因

中图分类号 Q24

肌动蛋白(actin)是构成细胞骨架的主要成分, 在所有物种的不同细胞中都有着高量而稳定的表达(Ma *et al*, 2007)。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)、两个细胞质型(β 亚型, γ 亚型)(Vandekerckhove *et al*, 1978)。 β -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 β -actin 氨基酸序列同源性均在 96% 以上(刘秀霞等, 2009), 有关软体动物的 β -actin 蛋白及基因序列系统研究尚未见报道。此外, β -actin 基因 mRNA 的表达几乎不随年龄增长而变化, 因此在测定某种 mRNA 的相对表达量时, 常采用 β -actin 基因 mRNA 作为内标(Zhong *et al*, 1999)。

曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni* de Rochebrune)俗称墨鱼、目鱼, 隶属软体动物门(Mollusca)、头足纲

(Cephalopoda)、十腕目(Decapoda)、乌贼科(Sepiidae)、无针乌贼属(*Sepiella*), 在我国沿海分布较广, 具有很高的经济价值(吴常文等, 2010)。迄今为止, 尚未见曼氏无针乌贼 β -actin 基因全序列的有关报道。本研究成功克隆了曼氏无针乌贼的 β -actin 基因全长 cDNA 序列, 为进一步研究曼氏无针乌贼 β -actin 基因的结构和功能提供了理论依据, 同时也为曼氏无针乌贼其它功能基因的研究提供可靠的分子内标。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)采自浙江大海洋科技有限公司秀山养殖基地。选择健康、活力好、未产卵的性成熟乌贼活体用于实验。

1.1.2 试剂 RNAiso Plus、RNA LA PCRTM Kit

* 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目“名贵头足类苗种规模繁育关键技术”, 2010AA10A404 号; 国家海洋公益性行业科研专项, 201005013 号; 国家自然科学基金项目, 31101937 号; 2011 年浙江省大学生科技创新(新苗人才计划)项目, 2011.05—2012.03。李继姬, E-mail: feiye2214@163.com

通讯作者: 吴常文, 教授, E-mail: wucw08@126.com

收稿日期: 2010-10-18, 收修改稿日期: 2010-12-25

(AMV) Ver.1.1、*Taq* DNA 聚合酶、Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0、pMD18-T Vector、*E. coli* DH5 α 购自宝生物工程(大连)有限公司; SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司; 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Version 2.0 购自 Gibco BRL 公司;

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

从曼氏无针乌贼快速分离卵巢组织, 按 RNAiso Plus 说明提取总 RNA。cDNA 第一链的合成使用 RNA LA PCR™ Kit (AMV) Ver.1.1 试剂盒, 操作按试剂盒推荐方法进行。

1.3 曼氏无针乌贼卵巢 β -actin cDNA 核心片段的克隆

根据已知软体动物栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*: AY335441.2)、太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*: AB071191.1)、紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*: AF157491.1)、海扇贝 (*Placopecten magellanicus*: U55046.1) 的 β -actin cDNA 序列保守区域设计合成一对同源引物:

ActB F: 5'-AGGGTGTTCATGGTTGGTAT-3'

ActB R: 5'-TCTTCATTGTGCTGGGAG-3'

以上述 cDNA 为模板, 用 *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 94℃ 预变性 3min, 94℃ 变性 1min, 57℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。预期 PCR 产物片段大小为 850bp。

1.4 曼氏无针乌贼卵巢 β -actin 基因 5'端 cDNA 扩增

根据克隆得到的曼氏无针乌贼 β -actin cDNA 核心片段及 5' RACE System 试剂盒要求设计 5' RACE 反转录引物 GSP-1: 5'-AGAACAGCCTGGATGG-3' 和两条 PCR 引物 GSP-2: 5'-AGTACAGGGTGCTCTTTA GGG-3', GSP-3: 5'-TTCCATGTCATCCCAATTAGTG-3', 5' RACE 的操作按试剂盒推荐方法进行。

利用 SUPERScript II RT 酶和引物 GSP-1 对总 RNA 进行目的基因第一链 cDNA 的合成; RNase Mix 对合成的 cDNA 进行去 RNA 处理; DNA Purification System: GLASSMAX DNA isolation spin cartridges 对经 RNAase 处理过的 cDNA 进行纯化; TdT 酶和 dCTP 对纯化后的 cDNA 进行末端加上多聚 C; 使用引物 GSP-2 和试剂盒里面带的桥连铆钉引物 AAP 对已经加 dC 尾的 cDNA 进行 PCR 第一轮扩增, 扩增条件: 94℃ 预变性 2min, 94℃ 变性 1min, 55℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 1min, 30 个循环, 72℃ 延伸 5min; 使用引物 GSP-3 和试剂盒里面带的桥连通用扩增引物 AUAP 进行巢式 PCR 第二轮扩增, 扩增条件: 94℃ 预变性 2min, 94℃ 变性 1min, 60℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 1min, 共 35 个

循环, 72℃ 延伸 5min。

1.5 曼氏无针乌贼卵巢 β -actin 基因 3'端 cDNA 扩增

根据已克隆的曼氏无针乌贼 β -actin cDNA 核心片段和 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒要求设计两个 3'-RACE 上游引物 3'122-1: CCAT-TGGTAACGAGAGGTTTCAGGTGCC, 3'122-2: TCGG TGGCTTCATCTTGGCTTCTCTGTC, 3' RACE 的操作按试剂盒推荐方法进行。

使用逆转录酶 SMARTScribe™ Reverse Transcriptase 和引物 3'CDS primer A 对总 RNA 进行逆转录合成 cDNA; 使用引物 3'122-1 和 UPM, 以上面合成的 cDNA 为模板进行第一轮 touchdown PCR 扩增; 将第一轮 PCR 扩增产物稀释 50 倍, 然后用引物 3'122-2 和 UPM 进行第二轮 touchdown PCR 扩增, 两轮扩增条件参照试剂盒说明。

1.6 PCR 产物的克隆

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 α , 挑取阳性克隆送往上海英骏生物技术有限公司测序。

1.7 曼氏无针乌贼 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

将获得的曼氏无针乌贼 β -actin 基因的全长 cDNA 序列与 GenBank 核酸数据库及蛋白数据库作 BLAST 分析。应用 ORF Finder 程序确定正确的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 并推导其编码的氨基酸序列。ProtParam 程序预测氨基酸序列的物理参数, Scratch 程序预测二硫键, Tmpredserver 分析跨膜结构, Sigal P 3.0server 程序预测信号肽, PSORT Prediction 程序基于其氨基酸序列预测蛋白质亚细胞定位点。BLASTp 于 GenBank 中进行相似性检索, ClustalX (Thompson *et al*, 1997) 软件对相应的氨基酸序列进行分析。然后用 MEGA 4.0 (Tamura *et al*, 2007) 软件, 采用邻位相接法 (NJ) 构建曼氏无针乌贼 β -actin 氨基酸序列与其它 19 种物种的 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。

2 结果与分析

2.1 曼氏无针乌贼 β -actin 基因 cDNA 核心片段及 RACE 产物的鉴定

以曼氏无针乌贼卵巢 cDNA 为模板, 用引物

ActB F 和 ActB R 进行 PCR 扩增, 得到 850bp 大小的 PCR 产物(图 1 左, 箭头所指)。将产物电泳纯化、回收后克隆至 pMD18-T 载体并送往上海英骏生物技术有限公司测序, 得到一个 853bp 的 cDNA 片段。

根据克隆的曼氏无针乌贼卵巢β-actin cDNA 核心片段设计 5 个特异引物 GSP-1、GSP-2、GSP-3、3'122-1 及 3'122-2 并利用 5'RACE 和 3'RACE 技术分别获得 2 个大小分别为 480bp 和 770bp 的 PCR 产物(图 1 中、右, 箭头所指)。对这 2 个片段进行克隆、测序, 得到大小分别为 484bp、775bp 的 cDNA 片段。

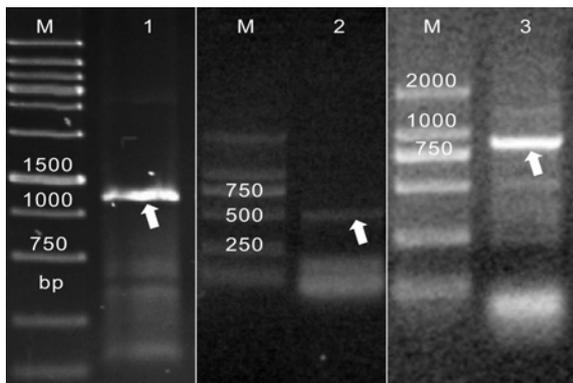


图 1 利用 RT-PCR 法扩增得到的曼氏无针乌贼 β-actin cDNA 片段及 RACE 扩增产物电泳图

Fig.1 Gel electrophoresis pattern of β-actin gene cDNA fragment amplified by RT-PCR from *S. maindroni* and RACE-PCR products

M: DNA 分子量标准; 左: RT-PCR 产物; 中: 5'RACE 扩增产物; 右: 3'RACE 扩增产物

2.2 曼氏无针乌贼β-actin 基因 cDNA 全长序列特征

通过序列拼接, 确定曼氏无针乌贼β-actin cDNA 全长为 2000bp (GenBank 登录号: JN564496), 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 1134bp, 编码 377 个氨基酸。哺乳动物、两栖动物和鱼类一般为 375 个氨基酸, 节肢动物和软体动物一般为 376 个氨基酸, 曼氏无针乌贼仅与淡水贝类三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*: HM045420.1)的氨基酸数相同。图 2 中 AATAAA 为推测的多聚腺苷酸加尾信号位点(Polyadenylation Signal Site)。

2.3 曼氏无针乌贼β-actin 基因氨基酸的序列特征

曼氏无针乌贼β-actin 基因 cDNA 开放阅读框含碱基 1134bp, GC 含量为 47.97%, 编码 377 个氨基酸, 预测得到的多肽链分子量大约为 42.0kDa, 理论等电点为 5.16, 原子总数 5851, 分子式为 C₁₈₅₇H₂₉₀₈N₄₉₄O₅₇₀S₂₂。其中, 谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、异亮氨酸(Ile)及丝

氨酸(Ser)含量最高均为 7.7%, 色氨酸(Trp)含量最少为 1.1% (图 3), 带负电荷氨基酸残基(Asp+Glu) 51 个, 带正电荷氨基酸残基(Arg+Lys) 36 个, 脂肪族氨基酸指数为 80.98。

曼氏无针乌贼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, 发现有 2 个跨膜结构, 分别为第 128—

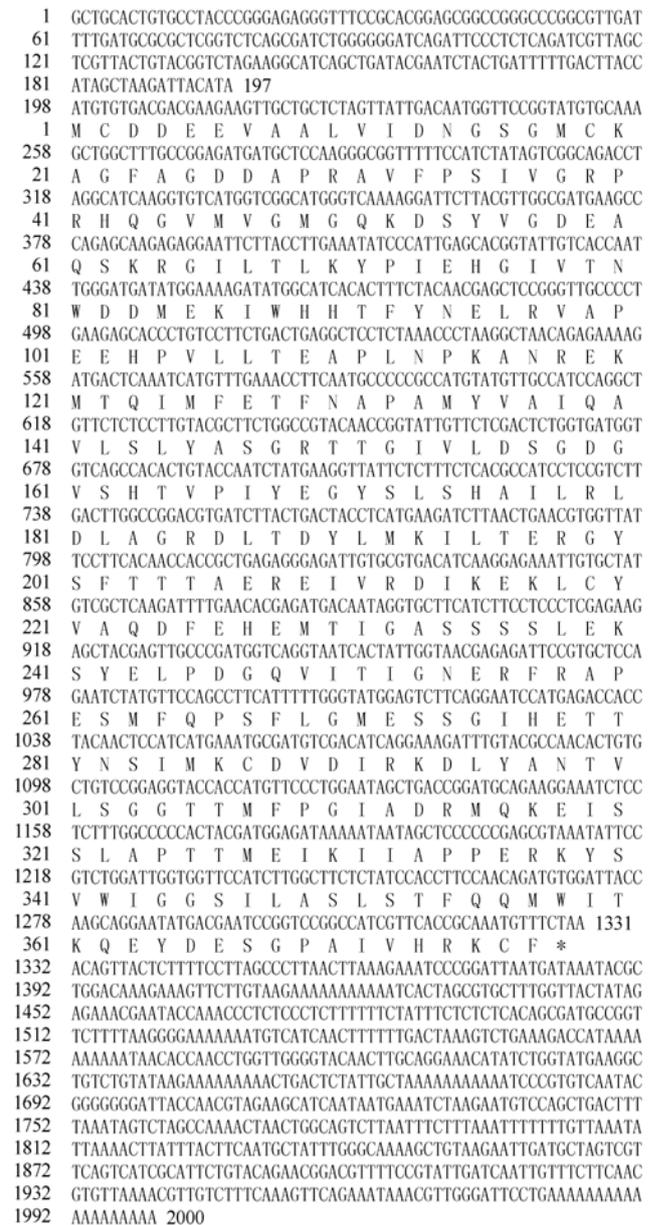
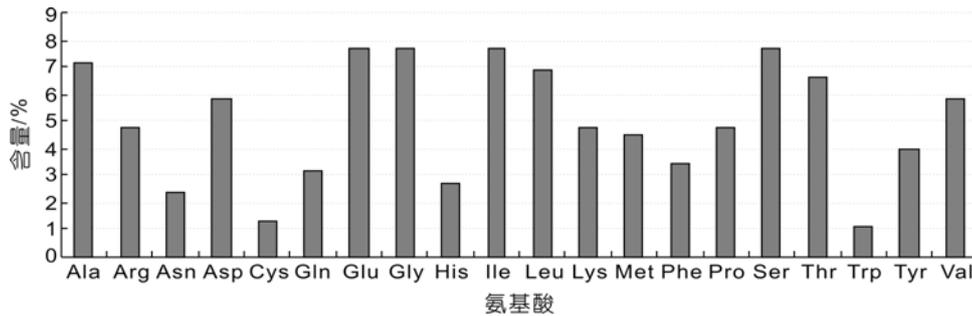


图 2 曼氏无针乌贼β-actin cDNA 全长及推导的氨基酸序列
Fig.2 Full-length of cDNA and deduced amino acid sequence of β-actin from *S. maindroni*

注: 下划线标出的是多聚腺苷酸加尾信号(AATAAA); *表示终止密码子

图3 曼氏无针乌贼 β -actin 氨基酸组成Fig.3 Amino acid composition of β -actin from *S. maindroni*

148 位和第 339—357 位。信号肽预测结果显示无信号肽, 蛋白质亚细胞定位为细胞骨架(44.4%)。

用 MEGA 4.0 软件将曼氏无针乌贼 β -actin 氨基酸序列与其它 18 种动物的 β -actin 氨基酸序列进行多序列比对, 结果见图 4。图 4 中, *S. maindroni*: 曼氏无针乌贼(JN564496.1); *M. musculus*: 小家鼠(BAE30426.1); *P. cinereus*: 澳洲树袋熊(AAY53911.1); *H. sapiens*: 人(NP_001092.1); *X. laevis*: 非洲爪蟾(NP_001082422.1); *R. lessonae*: 莱桑池蛙(AAQ18432.1); *O. mykiss*: 虹鳟(NP_001117707.1); *A. schlegelii*: 黑鲷(AAR84618.1); *P. flesus*: 川鲈(AAF63665.1); *O. moubata*: 毛白钝缘蜉(BAE46505.1); *L. vannamei*: 凡纳滨对虾(AAG16253.1); *A. albopictus*: 白纹伊蚊(ABG46341.1); *C. gigas*: 太平洋牡蛎(BAB84579.1); *M. yessoensis*: 虾夷扇贝(ABG78596.1); *P. fucata*: 合浦珠母贝(ACD99707.1); *H. cumingii*: 三角帆蚌(HM045420.1); *S. esculenta*: 金乌贼(GU338004.1); *T. pacificus*: 太平洋褶柔鱼(FJ611946.1); *A. germari*: 桑天牛(AY817141.1)。

Ala-Leu-Val-Val-Asp-Asn-Gly-Ser-Gly 为上述 18 种动物 N-末端保守序列, 而曼氏无针乌贼的这段保守序列的第四位氨基酸残基 Val 被 Ile 替换, 成为特异位点。所得的曼氏无针乌贼 β -actin 氨基酸序列的 N-末端保守区域 Ala-Leu-Val-Ile-Asp-Asn-Gly-Ser-Gly 与鸟类的 γ 型肌动蛋白(Rubenstein, 1990)序列相同, 因 γ -actin 的组织表达量远低于 β -actin (Rubenstein, 1990) 并未发现软体动物的 γ -actin 基因的相关报道, 所以针对曼氏无针乌贼 β -actin 基因氨基酸序列 N-末端保守区域的特殊性有待深入研究。保守序列的上游和下游分别是 Ala 和 Met 残基, 表示 β -actin 基因与胞质肌动蛋白异性体有密切关系(Pollard *et al*, 1986; Rubenstein, 1990)。

基于 β -actin 氨基酸序列采用 MEGA 4.0 软件以

NJ 法构建了 19 种动物的系统进化树(图 5), 曼氏无针乌贼与合浦珠母贝、金乌贼等软体动物门的其它物种聚在一起, 然后与节肢动物聚在一起, 再与脊椎动物的鱼类、两栖类、哺乳类聚在一起。曼氏无针乌贼基于 β -actin 基因的分子进化地位与其生物学分类地位大体一致。就所有软体动物

的聚类关系看, 头足类的曼氏无针乌贼、金乌贼以及太平洋褶柔鱼与所有贝类的进化关系区分并不明显, 这可能与 β -actin 氨基酸序列的极大保守性有关, 基于 β -actin 氨基酸序列分析系统进化的方法的可靠性有待进一步讨论。

3 讨论

本文采用 RT-PCR 和 RACE 技术, 首次克隆了曼氏无针乌贼 β -actin 基因的全长 cDNA 序列, 并分析获得 1134bp 的开放阅读框。目前国内外对软体动物 β -actin 基因的研究主要集中在海水贝类(Wang *et al*, 2008), 如太平洋牡蛎(Cadoret *et al*, 1999; Miyamoto *et al*, 2002)、大西洋深水扇贝(*Placopecten magellanicus*) (Patwary *et al*, 1996)、欧洲笠螺(*Patella vulgate*) (Van *et al*, 1993)、虹鲍(*Haliotis iris*) (Maxine *et al*, 2006)、虾夷扇贝(刘卫东等, 2008)、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*) (Ma *et al*, 2004), 以及头足类金乌贼(*Sepia esculenta*) (GU338004.1)和淡水贝类三角帆蚌(袁一鸣等, 2010)等。由于 β -actin 参与构成细胞骨架等重要生理功能, 本次推导得到的曼氏无针乌贼 β -actin 氨基酸序列不但与金乌贼、太平洋牡蛎、虾夷扇贝、合浦珠母贝、三角帆蚌等软体动物具有很高的相似性, 而且与凡纳滨对虾、虹鳟、黑鲷、川鲈等水产经济动物甚至小鼠、人等高等脊椎动物的相似性也高达 97%, 符合 β -actin 基因氨基酸编码区高度保守的特点(Ma *et al*, 2007; Zhong *et al*, 1999)。

ClustalX 比对结果显示曼氏无针乌贼 β -actin 基因氨基酸序列与其它同源序列存在着一定差异, 具体表现在 Ile12、Ser172、Ser174、Gln223、His227、Ile231、Gly232、Ser320、Glu328、Thr360 等 10 个氨基酸残基具有特异性。此外还发现几个特殊的氨基酸残基位点, 如: 第 155 位, 软体动物和节肢动物是

<i>S. maindroni</i>	MCDDEEVAAL	VIDNGSGMCK	AGFAGDDAPR	AVFPSIVGRP	RHQGVVMVGMG	QKDSYVGDEA	QSKRGLTLTK	YPIEHGIVTN	WDDMEKIWHH	TFYNELRVAP	100
<i>M. musculus</i>	- . D-I . . .	V									98
<i>P. cinereus</i>	- . -I . . .	V									97
<i>H. sapiens</i>	- . D-I . . .	V									98
<i>X. laevis</i>	-E. D-I . . .	V									98
<i>R. lessonae</i>	-E. D-I . . .	V . A									98
<i>O. mykiss</i>	-E. -I . . .	V									98
<i>A. schlegelii</i>	-E. -I . . .	V									98
<i>P. flesus</i>	- . -I . . .	V									98
<i>O. moubata</i>		V									99
<i>L. vannamei</i>		V									99
<i>A. albopictus</i>	W	V									99
<i>C. gigas</i>	G. E. . . .	V									99
<i>M. yessoensi</i>	. . . D- . .	V									99
<i>P. fucata</i>		V									99
<i>H. cumingii</i>	SGEDD . . .	V									100
<i>S. esculenta</i>		V									99
<i>T. pacificus</i>	. . . D- . .	V									99
<i>A. germari</i>	. . . D- . .	V I . .			99
<i>S. maindroni</i>	EEHPVLLTEA	PLNPKANREK	MTQIMFETFN	APAMYVAIQA	VLSLYASGRT	TGIVLDSGDG	VSHTVPIYEG	YLSHAILRL	DLAGRDLTDY	LMKILTERGY	200
<i>M. musculus</i>				T		M	T	A . P			198
<i>P. cinereus</i>				T		M	T	A . P			197
<i>H. sapiens</i>				T		M	T	A . P			198
<i>X. laevis</i>				T		M	T	A . P			198
<i>R. lessonae</i>				T		M	T	A . P			198
<i>O. mykiss</i>				T		M	T	A . P			198
<i>A. schlegelii</i>				T		M	T	A . P			198
<i>P. flesus</i>				T		M	T	A . P			198
<i>O. moubata</i>				T				A . P			199
<i>L. vannamei</i>				T				A . P			199
<i>A. albopictus</i>				T				A . P			199
<i>C. gigas</i>								A . P			199
<i>M. yessoensi</i>								A . P			199
<i>P. fucata</i>								A . P			199
<i>H. cumingii</i>				C				A . P . . M .			200
<i>S. esculenta</i>	. . . G TKS						A . P			199
<i>T. pacificus</i>		. . . D . .	S . . N . .					A . P			199
<i>A. germari</i>			T					A . P			199
<i>S. maindroni</i>	SFTTTAEREI	VRDIKEKLCY	VAQDFEHMT	IGASSSSLEK	SYELPDGQVI	TIGNERFRAP	ESMFQPSFLG	MESSGIHETT	YNSIMKCDVD	IRKDLYANTV	300
<i>M. musculus</i>	. . . K L . . Q . A	TA C AL C . . .	F		298
<i>P. cinereus</i>		. . . R L . . Q . A	TA C AL C . . .	F		297
<i>H. sapiens</i>			. . . L . . Q . A	TA C AL C . . .	F		298
<i>X. laevis</i>			. . . L . . Q . A	TA C AL C . . .			298
<i>R. lessonae</i>			. . . L . . Q . A	TA C AL C . . .			298
<i>O. mykiss</i>			. . . L . . Q . G	TA C AL C . . .			298
<i>A. schlegelii</i>			. . . L . . Q . G	TA C AL C . . .			298
<i>P. flesus</i>			. . . L . . Q . G	TA C AL C . . .			298
<i>O. moubata</i>			. . . L . . Q . A	TA C AL C I . .		299
<i>L. vannamei</i>	T L . . Q . .	TA C AL C . . .			299
<i>A. albopictus</i>			. . . L . . Q . A	TA C AL AC . . .			299
<i>C. gigas</i>			. . . L . . Q . A	TA C L A . . .			299
<i>M. yessoensi</i>			. . . L . . S . S	TA . A C L A . . .			299
<i>P. fucata</i>			. . . L . . Q . A	TA A A A . . .			299
<i>H. cumingii</i>			. . . L . . Q . S	TA C AL A . . .			300
<i>S. esculenta</i>			. . . L . . Q . A	TA C L A . . .			299
<i>T. pacificus</i>			. . . L . . Q . A	TA C L A . . .			299
<i>A. germari</i>			. . . L . . Q . A	TA . A . T C AL C . . . V			299
<i>S. maindroni</i>	LSGGTTFMFG	IADRMQKEIS	SLAPTTMEIK	IIAPPERKYS	VWIGGSILAS	LSTFQQWIT	KQEYDESGPA	IVHRKCF			377
<i>M. musculus</i>	. . . Y T . . .	A . . S . K S S . . .				375
<i>P. cinereus</i>	. . . Y T . . .	A . . S . K S S . . .				374
<i>H. sapiens</i>	. . . Y T . . .	A . . S . K S S . . .				375
<i>X. laevis</i>	. . . Y T . . .	A . . S . K S S . . .				375
<i>R. lessonae</i>	. . . Y T . . .	A . . S . K S S . . .				375
<i>O. mykiss</i>	. . . Y T S . K S S . . .				375
<i>A. schlegelii</i>	. . . Y T . . .	A . . S . K .	V S S . . .				375
<i>P. flesus</i>	. . . Y T . . .	A . . S . K S S . . .				375
<i>O. moubata</i>	. . . Y T . . .	A . . S . K S S . . .				376
<i>L. vannamei</i>	. . . Y T . . .	A . . S . K S S . . .				376
<i>A. albopictus</i>	. . . Y T . . .	A . . S . K S S . . .				376
<i>C. gigas</i>	. . . Y T . . .	A . . S . K S S . . .				376
<i>M. yessoensi</i>	. . . Y T . . .	A . . S . K S S . . .				376
<i>P. fucata</i>	. . . S T . . .	A . . S . K S S . . .				376
<i>H. cumingii</i>	. . . S T P . K .	V P S S . . .				377
<i>S. esculenta</i>			. . . S . K S S . . .				376
<i>T. pacificus</i>	. . . S L . .	T . A . . P . K S S . . .				376
<i>A. germari</i>	. . . Y T . . .	A . . S . K S G . . .				376

图 4 曼氏无针乌贼与其它动物的 β -actin 氨基酸的多序列比对结果

Fig.4 Alignment of amino acid sequences of β -actin from *S. maindroni* and other species

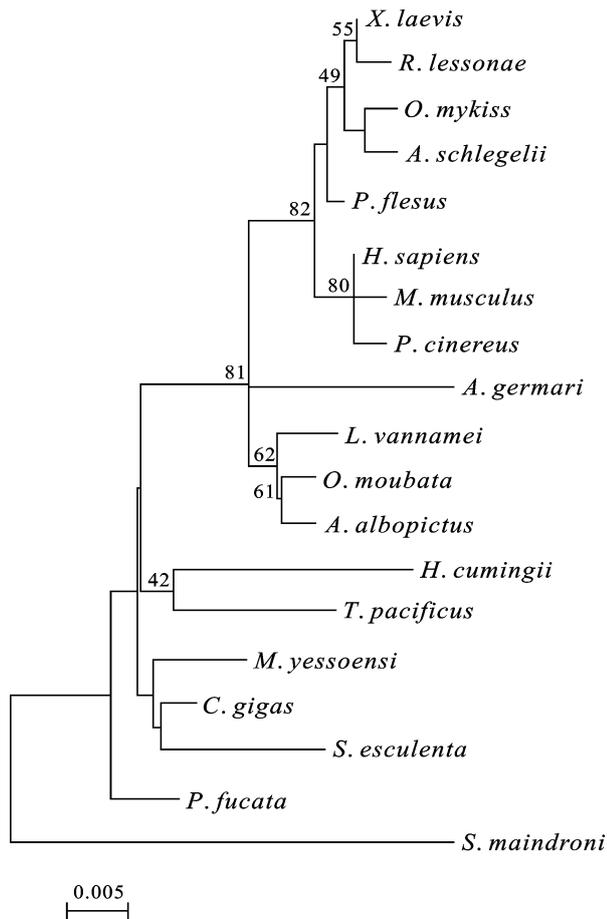


图5 根据 β -actin 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树

Fig.5 NJ phylogenetic tree of β -actin of species

注: 图例说明同图4

Leu, 而脊椎动物均为 Met。第 281 位, 哺乳动物为 Phe, 其它物种均为 Try。通过序列比对还发现了一些软体动物特有的氨基酸残基, 如第 274 位, 曼氏无针乌贼是 Ser, 其它软体动物为 Ala, 剩余物种均为 Cys; 第 308 位, 软体动物为 Phe, 其它物种均为 Try。包括曼氏无针乌贼在内的大多数无脊椎动物 β -actin 氨基酸序列以 Met-Cys 开始, 后面跟着以 Glu 或 Asp 开头的氨基酸簇, 而脊椎动物缺少 Cys (Kusakabe *et al.*, 1997)。其后是一段 9 个残基的 N-端保守序列 Ala-Leu-Val-Val-Asp-Asn-Gly-Ser-Gly, 与其它 18 种动物不同的是, 曼氏无针乌贼的这段保守序列的第 4 位氨基酸残基 Val 被 Ile 替换, 成为特异位点。Rubenstein(1990)以鸟类为例, 将胞质非肌肉型肌动蛋白分为 β 型和 γ 型两类, γ 型肌动蛋白的 9 残基保守序列为 Ala-Leu-Val-Ile-Asp-Asn-Gly-Ser-Gly, 与 β 型仅相差第 4 位残基 Val。本研究所得的曼氏无针乌贼序列 N-端保守区域与鸟类的 γ 型肌动蛋白序列相同, 由于 γ -actin 的组

织表达量远低于 β -actin (Rubenstein, 1990)并尚未发现软体动物的 γ -actin 基因的相关报道, 因此针对曼氏无针乌贼 β -actin 基因氨基酸序列 N-末端保守区域的特殊性有待深入研究。所分析的 19 种动物的 N-端保守序列的上游和下游分别是 Ala 和 Met 残基, 表示 β -actin 基因与胞质肌动蛋白异性体有密切关系 (Pollard *et al.*, 1986; Rubenstein, 1990)。建树结果显示, 曼氏无针乌贼与合浦珠母贝、金乌贼等软体动物门的其它物种聚在一起, 然后与节肢动物聚在一起, 再与脊椎动物的鱼类、两栖类、哺乳类聚在一起, 与其生物学分类地位一致。

β -actin 基因一直以来被作为内参基因广泛应用于基因 mRNA 的相对表达实验。鱼类以及无脊椎动物的分子生物学研究中, β -actin 基因是最常用的内参基因 (Gutala *et al.*, 2004), 如草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) (王欣欣等, 2008)、栉孔扇贝 (胥炜等, 2005)、皱纹盘鲍 (Ma *et al.*, 2004)、合浦珠母贝 (Wang *et al.*, 2008) 等, 且表达稳定。基于 β -actin 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), 所以 β -actin 基因 5'侧翼序列的克隆为转基因曼氏无针乌贼研究奠定基础, 也是今后的研究工作重点。

参 考 文 献

- 王欣欣, 孙宝剑, 昌鸣先等, 2008. 草鱼免疫球蛋白 M 重链基因的克隆及表达. 水产学报, 32(1): 13—20
- 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
- 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
- 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
- 吴常文, 董智勇, 迟长凤等, 2010. 曼氏无针乌贼 (*Sepiella maindroni*) 繁殖习性及其产卵场修复的研究. 海洋与湖沼, 41(1): 39—46
- 胥 炜, 王 昊, 宋林生等, 2005. 栉孔扇贝 C 型凝集素基因的克隆与表达研究. 高技术通讯, 15(1): 83—88
- 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
- Gutala R V, Reddy P H, 2004. The use of real-time PCR analysis in a gene expression study of Alzheimer's disease post-mortem brains. Neurosci Methods, 132(1): 101—107
- 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
- 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: 289—298
- 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
- Ma H M, Xu W, Mai K S *et al*, 2004. Cloning and characterization of an abalone (*Haliotis discus hannai*) actin gene. *Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research)*, 3(2): 145—149
- Maxine J, Heather J F, Frank Y T, 2006. Isolation, characterization and expression analysis of three actin genes in the New Zealand black-footed abalone, *Haliotis iris*. *Marine Biotechnology*, 8(2): 110—119
- Miyamoto H, Hamaguchi M, Okosh K, 2002. Analysis of genes expressed in the mantle of oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Sci*, 68(3): 651—658
- 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
- Pollard T D, Cooper J A, 1986. Actin and actin binding proteins: A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem*, 55: 987—1035
- Rubenstein P A, 1990. The functional importance of multiple actin isoforms. *Bio Essays*, 12(7): 309—315
- 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: 1596—1599
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F *et al*, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876—4882
- Van Loon A E, Goedemans H J, Daeme A J J M *et al*, 1993. Actin genes expressed during early development of *Patella Vulgate*. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 202: 77—84
- 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
- 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: 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 ANALYSIS OF THE FULL-LENGTH cDNA SEQUENCE OF *SEPIELLA MAINDRONI* β -ACTIN GENE

LI Ji-Ji, GUO Bao-Ying, WU Chang-Wen

(*Marine Science College of Zhejiang Ocean University, Key Laboratory of Mariculture Equipments and Engineering Technology of Zhejiang Province, Zhoushan, 316004*)

Abstract In this paper, a 2000bp full-length cDNA sequence of β -actin gene from *Sepiella maindroni* was obtained with RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique. It consists of a 197bp 5' untranslated region (UTR), an 1134bp open reading frame (ORF) and a 669bp 3'UTR. The translated protein is composed of 377 amino acids, with 42.0kDa molecular weight, and its calculated isoelectric point was 5.16. The amino acid sequence of β -actin in *Sepiella maindroni* has ten specific amino acid residues: Ile12, Ser172, Ser174, Gln223, His227, Ile231, Gly232, Ser320, Glu328 and Thr360, respectively. In addition, two other particular base sites of amino acid residues were found in these sequences. Similarly, two characteristic amino acid residues of some mollusks were obtained. The amino acids sequence of β -actin in *Sepiella maindroni* shared the high similarity with Molluscs, Arthropod and Vertebrate animals (97%). Neighbor-Joining (NJ) tree suggested that *Sepiella maindroni* clustered with Mollusca firstly, and then clustered with Arthropoda, finally clustered with Fish, Amphibians, and Mammals.

Key words *Sepiella maindroni*, cDNA, Rapid amplification of cDNA ends (RACE), β -actin gene