

美国红鱼和大黄鱼 - 珠蛋白基因的克隆和遗传进化分析

褚武英, 张平, 钱荣华, 印遇龙, 黄琳

(1. 中国科学院亚热带农业生态研究所, 湖南长沙 410125; 2. 浙江大学生物医学与仪器工程学院, 浙江杭州 310027)

摘要 根据已发表的其他脊椎动物 - 珠蛋白基因序列设计并合成1对特异性引物, 通过RT-PCR方法首次克隆到美国红鱼和大黄鱼 - 珠蛋白cDNA, 其开放读码框均由447个碱基组成, 编码148个氨基酸的多肽, 预测的相对分子量分别为16 333和16 148 Da, 两者核苷酸序列和推导的氨基酸序列同源性分别为90.4%与81.2%。将推导的美国红鱼和大黄鱼 - 珠蛋白氨基酸序列与其他鱼类及人 - 珠蛋白氨基酸序列进行同源性比较, 其同源性在35.5%~70.3%, 它们与同属真口鱼纲的真鲷、黄尾鲱鱼、鲤鱼、虹鳟等的同源性较高, 而与肉鳍鱼纲的肺鱼及板鳃纲的鲨鱼的同源性较低; 二级结构预测表明, 美国红鱼和大黄鱼 - 珠蛋白存在类似哺乳动物的8个 - 螺旋区, 在近端与远端与血红素结合的组氨酸高度保守。

关键词 美国红鱼; 大黄鱼; - 珠蛋白; 克隆

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)09-02555-03

Molecular Cloning and Genetic Evolution Analysis of γ -globin cDNAs from Red Drum and Large Yellow Croaker

CHU Wu-ying et al (Department of Biomedical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027)

Abstract The γ -globin gene and amino acid sequence of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and red drum (*Sciaenops ocellatus*) were first described. The entire open reading frames of two γ -globin genes were both 447 bp long and codified 148 amino acid residues. The homology between them was 90.4% for nucleotides and 81.2% for deduced amino acids. Amino acid identity of two γ -globin genes compared with those reported in other vertebrates including shark teleosts and human, ranged from 35.5 to 70.3%. The proximal histidine residues at the heme binding region and the important functional residues that were involved in the contacts with the heme and between interfaces were conserved.

Key words Red drum; Large yellow croaker; γ -globin; Cloning

脊椎动物的血红蛋白(Hb)都是细胞内的载氧蛋白,由珠蛋白和血红素构成。原始的脊椎动物如七鳃鳗的血红蛋白是单聚体,更高等的脊椎动物的Hb是由2条 - 珠蛋白链和2条 - 珠蛋白链所组成的四聚体^[1]。近年来国外对鱼类Hb的晶体结构、生理功能、分子进化等进行了研究并取得了长足进展,但是欧美和日本学者将研究集中在青鱼、斑马鱼等少数几种模式鱼类,而其他鱼类珠蛋白及其基因的研究报道很少。石首鱼科的大黄鱼是我国特有的经济鱼类之一,以体色金黄、味道鲜嫩而闻名。笔者克隆了大黄鱼和美国红鱼的珠蛋白基因,并将两者氨基酸残基序列进行了比较,为下一步体外重组基因导入试验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料 大黄鱼和美国红鱼系浙江省象山港的健康成鱼,体重约400 g,于流水试验槽中控温暂养1周,暂养期间水温控制在(22 ± 2)℃,溶氧6 ng/L,每日投喂约占体重1.5%的颗粒饵料。

1.2 菌株和质粒 E.coli DH5 α 菌株该室保存,克隆载体pGEMT Easy vector 购自Promega公司。

1.3 工具酶与试剂 限制性内切酶、2 000 bp DNAmarker 购自大连宝生物工程公司, RNA提取试剂盒购自QIAGEN公司,其他试剂均购于上海生工生物工程公司,引物由上海博亚生物工程技术有限公司合成。

MHY	A T G G T C G A T T G G A C A G A T G C T G A G C G A	51
DHY	A T G G T C G A T T G G A C A G A T G C T G A G C G T G C T G C T A T C G T A T C C C T G T G G G G A	51
MHY	A A G A T C G A T G T G G G T G A G A T T G G A C C C C A G G C A	102
DHY	A A G A T C A A T G T G G C T G A A A T T G G A C C C C A G G C T C T G G C C A G G C T C C T G A T T	102
MHY	G T G T A T C C C T G G A C T C A G A G A C A C T T T C A A G G G A	153
DHY	G T G T A T C C C T G G A C T C A G A G A C A C T T T C G G T G C G T T T G G C A A C A T T T C C A C T	153
MHY	G C C G C T G C C A T C A T G G G A A A C G A A A A A G T G G C C G A G C A T G G T A A G G T A G T G	204
DHY	A A C G C T G C C A T C C T G G G A A A C C A A A A A G T G G C C G A C C A T G G T A A G A T A G T G	204
MHY	A T G G G T G G T C T G G A C A G A G C T G T G A A G A A C A T G G A C A A C A T C A A G A A T G T C	255
DHY	A T G G G T G G T G C T G G A A A G A G C T G T G A A G A A C T T G G A C A A C A T C A A G G A A G T C	255
MHY	T A T A A A G A C C T G A G C A T T A A G C A C T C T G A G A A A A T C C A T G T G G A T C C T G A T	306
DHY	T A C A A A A C C C T G A G C G T G A A G C A C T C T G A C A T A A T C C A T G T G G A T C C T G A T	306
MHY	A A C T T C A G G C T T C T T G C T G A A A T C A T C A C T A T G T G T G T G G G T G C C A A G T T T	357
DHY	A A C T T C A G G C T T C T T G C T G A A A T C A T C A C T A T A T G T G T G G G T G C C A A G T T T	357
MHY	G G C C C C T C C G T C T T C A C C C C T G G T G T C C A A G A A G C T T G G C A G A A G T T C C T G	408
DHY	G G C T C C G C C G G C A T C A A C C C T G A T G C C C A A G C A G C T T G G C A G A A G T T C C T G	408
MHY	G C T G T G G T C G T C T C T G C C C T G G G C A G A C A G T A C C A C T G A	447
DHY	T C T G C G G T C G T C T C T G C C C T G G G C A G A C A G T A C C A C T A A	447

图1 大黄鱼和美国红鱼 - 珠蛋白核苷酸序列

基金项目 中国科学院海外杰出学者基金项目(2005-1-4,1-7);国家973项目(2004CB117502);国家自然科学基金项目(30671517, 30528006)。

作者简介 褚武英(1971-),男,江西南昌人,博士,助理研究员,从事动物分子营养学研究。

收稿日期 2006-12-22

1.4 总RNA的提取与反转录 取新鲜脾脏组织10 ng,用QIAGEN公司RNeasy Mini Kit介绍的方法提取鱼脾的总RNA,电泳分析RNA质量。以Oligo dT引导反转录合成cDNA。

1.5 引物设计及PCR扩增 比较GenBank中已报道的鱼类和其他脊椎动物 - 珠蛋白基因序列的同源性设计1对引物

(上游引物 H1 :5 - ATGGTTCGATTGGACAGATGCT -3 ,下游引物 H2 :5 - TCAGTGGTACTGTCTGCCAG -3)。PCR 扩增条件为预变性 94 5 min; 变性 94 30 s, 退火 54 30 s, 聚合 72 45 s, 共 30 个循环; 72 延伸 10 min, 4 保存。

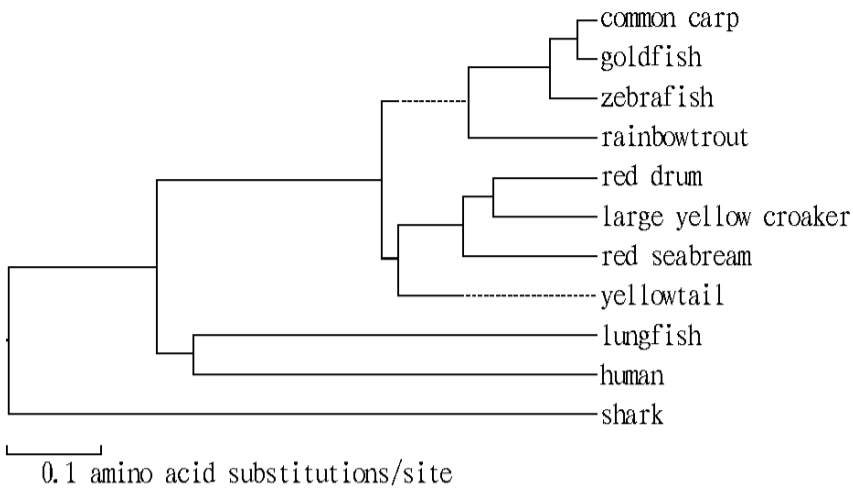


图2 根据美国红鱼、大黄鱼和其他脊椎动物 - 珠蛋白氨基酸序列建立的系统进化树

1.6 PCR 产物序列测定 PCR 产物用低熔点琼脂糖凝胶电泳法纯化和回收目的扩增片段, 在 T4DNA 连接酶作用下, 将回收的 DNA 片段直接插入 pGEMTEasy vector 载体, 构建重组质粒。转化感受态大肠杆菌 DH5 , 用蓝白斑和电泳酶切法筛选重组子。DNA 测序在 ABI PRISM377 全自动荧光测序仪上进行。

泳法纯化和回收目的扩增片段, 在 T4DNA 连接酶作用下, 将回收的 DNA 片段直接插入 pGEMTEasy vector 载体, 构建重组质粒。转化感受态大肠杆菌 DH5 , 用蓝白斑和电泳酶切法筛选重组子。DNA 测序在 ABI PRISM377 全自动荧光测序仪上进行。

1.7 测序结果分析及与其他物种序列的比较 利用 DNAs-tar 软件对所测核苷酸序列及推导的氨基酸序列进行编辑; Clustal W 软件用于同源性分析; 用 PHD 程序预测其二级结构。

1.8 相对分子质量和等电点计算 使用 www.expasy.ch 网站的 Compute pI/ MW 程序进行。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果和重组质粒酶切鉴定 采用 H1/ H2 引物, 以提取的大黄鱼和美国红鱼脾脏 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 取 3 μ 扩增产物进行电泳, 结果可检测到约 450 bp 条带。重组质粒经 EcoR 单酶切, 产生与预期值相符的片断。

	+-----A-----++-----B-----++---C---+	+---D---++---				
red drum beta	MVDWTD AERAA IASLW G K I D V G E I G P Q A L A R L L I V Y P W T Q R H F K G F G N I S T A A A I M G N E K		60			
cuneate drum T G A N L	60			
P. crocea V N . A G A N L Q .	60			
L. xanthurus K A S G A N L A .	60			
common carp	.. E S I G L N P D . L C Y . A S L . S P P .	60			
goldfish	.. E S I G L N P A . L C Y . A T L . S P P .	60			
rainbow trout IV P S V G S . D S S T L P P A	60			
Atlantic salmon S V G S . D S S T L P P A	60			
catfish	.. X X S T L N L P .	60			
electric eel	.. E L . E . Q . G V N H L S P D Y . A S S P .	60			
yellowtail S T T V N L P .	60			
zebrafish	.. E T L G L N I D S . C Y . A T L . S P P .	60			
lungfish	.. H . E K Q Y . V . V F S D H V . A N T . E . V F K . Y . N S D L . S P G K H . N .		60			
rockcod	.. E K S I . S D I F S H M . Y D D K S . C S L Y N . E I A N	60			
rainbow trout I	.. E K S T . S A V V N I D L V Y . G S V P P .	60			
dragonfish	.. N K T . K . T . T D I F S H L . Y D D K S . C Y . S L Y N L A .	60			
red gurnard	.. E F T . Q D I F S . N . Y E T V A T . T . T V L . Y . A K C S T L K E	60			
human	.. H L . P E . K S . V T A V N . D . V . G E G V F . E S D L P D . V P .	60			
	-----E-----+	+---F---+	+-----G-----+			
red drum beta	V A E H G K V V M G G L D R A V K N M D N I K N V Y K D L S I K H S E K I H V D P D N F R L L A E I I T H C V G A K F G		120			
cuneate drum	.. A T L . K D A V V	120			
P. crocea	.. D I E L E I V D I	120			
L. xanthurus T Q Q G	120	
common carp	.. A R T E I A T . A P . W M L D C V . A A M	120	
goldfish	.. A R T E I A T . A P . W M L D C V . A A M	120	
rainbow trout IV	.. K T H Q . L . D I . I A . V M L D C V . A L .	120		
Atlantic salmon	.. K T H Q . L . D A . I A . V M L D C V . A L .	120		
catfish	.. A T E L G T . A N . K M T . I . L A	120	
electric eel	.. A V . A K L N G T . A A . T I L S F . V S . A M	120	
yellowtail	.. Q T E N L . D T . A K Q M L T C . S V A	120
zebrafish	.. A R T E I V T . A A . V M L D C V . A A M	120	
lungfish	.. S A R K . L A A I I E C I R H F G G H L A N . H L L H V . G Q C L R I E L A . A L .				120	
rockcod	.. A I K . L H G A A I . A T L L K S D C I V L A M .	120	
rainbow trout I	.. A C . A K G L A I S . E T . A N . L F V D V L . I V I A	120	
dragonfish I K . L H L G L . K E A A . A S L L K S D C I V L A L .	120	
red gurnard	I . K I T I L H G I . A E K L L S D C L . I V . A M .	120	
human	.. K A K . L . A F S D G L A H L L . G I F A I E L . C D . L E G N V L V C V L A H H		120	
	+-----H-----+					
red drum beta	P S V F T P G V Q E A W Q K F L A V V V S A L G R Q Y H		148			
cuneate drum	A A G . S . D T S A	148			
P. crocea	S A G I N . D A . A S A	148			
L. xanthurus	.. A E I H		148			
common carp	.. G . S . N S C	148			
goldfish	.. G . N A D C C	148			
rainbow trout IV	.. A S A D T F	148			
Atlantic salmon	.. T S A D I F	148			
catfish D F F	148			
electric eel	.. G . N A E T . H . L A E K	148			
yellowtail	K Q A D S	148			
zebrafish	Q A G . N A D C	148			
lungfish	F K E E R N A Y F M D . I S H S E	148			
rockcod	- H A A E T . G . G K	148			
rainbow trout I	- A S E I . A T M K A . M . S R . F	148			
dragonfish	- . A A E T . A T F G A . M - K	148			
red gurnard	- K D G E A . F S N S	148			
human	- K E P A . Y V V . G . A N A H K	148			

注: 螺旋区的开始和结束分别用(+)和(-)表示。

图3 美国红鱼、大黄鱼与其他物种 - 珠蛋白序列的比较

2.2 大黄鱼和美国红鱼 珠蛋白核苷酸序列分析与比较
测序结果显示(图1),所克隆的美国红鱼和大黄鱼 - 珠蛋白基因片断长度(含两端引物)均为447 bp,编码148个氨基酸(GenBank 登录号分别为AY876899和AY834212),其推导的相对分子质量分别为16 333和16 148 Da,等电点分别为8.71和8.76。两者核苷酸序列同源率为90.4。

2.3 大黄鱼和美国红鱼 - 珠蛋白氨基酸序列与数据库部分序列的同源性分析 美国红鱼、大黄鱼与其他鱼类的 - 珠蛋白氨基酸序列的同源性比较结果显示:同属石首鱼科的美国红鱼、大黄鱼同源率为81.1%;美国红鱼、大黄鱼与同属鲈形目的真鲷、黄尾鲱鱼同源率高达67.5%~70.3%;它们与同属真口鱼纲的真鲷、鲤鱼、金鱼、虹鳟的同源性在50%~56%;而美国红鱼、大黄鱼与肉鳍鱼纲的肺鱼及板鳃纲的鲨鱼的同源性较低,分别为39%、41%和36.2%、35.7%。美国红鱼、大黄鱼与高等脊椎动物如人的珠蛋白氨基酸序列同源性仅为49.3%、49.7%(图2)。二级结构预测表明,美国红鱼和大黄鱼 - 珠蛋白存在类似哺乳动物的7个 α -螺旋区,它们在GH螺旋间区及H螺旋区前部有连续5个不同氨基酸;与哺乳动物相比,两者在近端与远端与血红素结合的组氨酸高度保守(图3)。

3 讨论

该研究首次报道了美国红鱼、大黄鱼 - 珠蛋白基因的cDNA序列,并从基因的核苷酸序列推断出其氨基酸序列。Maruyama把硬骨鱼珠蛋白分为4类:胚胎Hb族、Noto亚目主要成年Hb族、阳性成年Hb族、阴性成年Hb族^[3],根据美国红鱼、大黄鱼和其他脊椎动物 - 珠蛋白氨基酸序列建立的系统进化树分析,美国红鱼、大黄鱼 - 珠蛋白应属于阳性成年Hb族,它们的氨基酸序列与同属鲈形目的真鲷、黄尾鲱鱼同源性较高,而与板鳃纲的鲨鱼和肉鳍鱼纲的肺鱼同源性较低,这说明鱼类珠蛋白进化关系较近的物种 - 珠蛋白氨基酸序列的相似性与其从形态解剖所得的系统进化关系是一致的^[4-5](图2)。

硬骨鱼和高等的脊椎动物血红蛋白都是由2对不同珠蛋白链组成的四聚体分子(如 $\alpha_2\beta_2$),4条珠蛋白多肽链与血红素辅基的协同作用才能完成血红蛋白的载氧功能。血红蛋白四聚体有2种不同接触面: $\alpha_1\beta_1$ 和 $\alpha_1\beta_2$ 。 $\alpha_1\beta_1$ 接触面对二聚体的稳定起重要作用。将美国红鱼、大黄鱼 - 珠蛋白

与人的珠蛋白核苷酸序列相比较,结果发现:它们都有10个与血红素结合的氨基酸残基;美国红鱼有8个和 $\alpha_1\beta_1$ 接触面相关的氨基酸残基,大黄鱼只有7个 $\alpha_1\beta_1$ 界面相关的氨基酸残基;美国红鱼、大黄鱼分别有11、10个和 $\alpha_1\beta_2$ 界面相关的氨基酸残基;它们在近端与远端与血红素结合的组氨酸高度保守(图3);二级结构预测表明,美国红鱼和大黄鱼 - 珠蛋白存在类似哺乳动物的7个 α -螺旋区,它们在GH螺旋间区及H螺旋区前部有连续5个不同氨基酸,在此区域大黄鱼和美国红鱼各有4个 $\alpha_1\beta_1$ 接触界面相关位点,此区域 $\alpha_1\beta_1$ 接触界面差异能否影响Hb的别构效应有待进一步研究。

鱼类是较原始的水生脊椎动物,其分布的范围广、生存环境及对水中溶氧量的耐受性差异较大,从耐低溶氧鱼类中珠蛋白基因导入不耐低溶氧鱼类中将有可能提高受体鱼对低溶氧的耐受性,Yoshizaki等已将鲫鱼的珠蛋白基因转入不耐低溶解氧的虹鳟中^[6],其氧耐受性是否改良还在研究中。1995年苏跃中对大黄鱼稚幼鱼的临界氧量及耗氧率试验,结果表明其窒息点较黑鲷、鲈鱼要高,比香鱼、梭鱼等溯河性鱼类要高得多,说明大黄鱼稚幼鱼的耐低氧能力较弱,对溶氧的要求较高,在高密度育苗时,容易出现缺氧死亡^[7],而在美国红鱼养殖的实际过程中,曾短时间内出现过0.3~0.5 mg/L的低氧状况而红鱼未出现死亡现象^[2]。因此,如能运用基因工程技术将美国红鱼珠蛋白基因导入大黄鱼体内可能增加后者的携氧能力,这对解决大黄鱼活鱼运输和高密度养殖缺氧死亡难题以及种质改良具有重要意义。

参考文献

- [1] ALISON BROWNIE, CANDACE HERSEY, ANDREW C OXIES, et al. Characterization of embryonic globin genes of the zebrafish[J]. *Developmental Biology*, 2003, 255: 48-61.
- [2] 闽信爱. 海水网箱养鱼[M]. 北京: 金盾出版社, 2002: 25-29.
- [3] KOICHI MARUYAMA, SHIGEKI YASUMASU, ICHIRO IUCHO. Evolution of globin genes of the nishikigoi, *Oryzias latipes*[J]. *Mechanisms of Development*, 2004, 121: 753-769.
- [4] OKAMOTO K, SAKAI M, MYATA M. Molecular cloning and sequence analysis of α - and β -globin cDNAs from yellowtail sea bream, *Siganus undecimradiatus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2001(130): 207-216.
- [5] LANFRANCHI G, PALLAMICINI A, LAVEDER P, et al. Ancestral hemoglobin switching in lampreys[J]. *Dev Biol*, 1994, 164: 402.
- [6] YOSHIZAKI G. Introduction of cap β -globin gene into rainbow trout[J]. *Jap Soc Sci Fish*, 1991, 57(5): 819-824.
- [7] 苏跃中, 游岚. 大黄鱼稚幼鱼的临界氧量及耗氧率的初步研究[J]. 福建水产, 1995(4): 21-25.