

# 青鳉的一种 *PABP* 基因电子克隆及其鉴定

孙业盈, 单长民 (滨州医学院基础学院, 山东烟台 264003)

**摘要** [目的] 克隆分析青鳉的一种 *PABP* 基因。[方法] 利用生物信息学手段克隆了青鳉的一种 *PABP* 基因的全长 cDNA 序列, 并对其序列进行了分析。[结果] 该 cDNA 序列包含 780 bp 的开放阅读框, 编码 259 个氨基酸。氨基酸序列同源性和进化的分析表明, 青鳉的 *PABP* 蛋白与半滑舌鳎 *ePABP2* 具有较高的同源性。[结论] 所获得的青鳉的 *PABP* 基因与其他物种的 *ePABP2* 基因同源。

**关键词** 黄金鲈鱼; *ZP* 基因; 电子克隆; 生物信息学

**中图分类号** Q959.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)26-12423-02

## Silico Cloning of a Kind of *PABP* Gene in *Oryzias latipes*

SUN Ye-ying et al (Basic College, Binzhou Medical University, Yantai, Shandong 264003)

**Abstract** [Objective] The study aimed to clone and analyze one *PABP* gene of *Oryzias latipes*. [Method] The *PABP* gene of *Oryzias latipes* was obtained and analysed by bioinformatics method. [Result] The sequence of the gene contained 780 bp open reading frame (ORF) and encoded 259 amino acids. The analysis of alignment and molecular evolution showed that the *PABP* protein was much similar with *ePABP2* of half-smooth tongue sole. [Conclusion] The *PABP* gene of *Oryzias latipes* was homologous with the *ePABP2* gene of other species.

**Key words** *Oryzias latipes*; *PABP* gene; Silico clone; Bioinformatic

绝大多数真核生物成熟 mRNA 分子都具有一段 poly (A) 尾, 它与 mRNA 稳定性及翻译起始的调节有关。Poly (A) 结合蛋白 [poly (A)-binding protein, PABP] 是 RNA 结合蛋白超家族的一个亚族, 能与真核生物 mRNA 的 poly (A) 尾结合<sup>[1]</sup>。PABP 在活跃生长的细胞中含量较为丰富, 与 20 个碱基长度以上的寡聚 A 有很高的亲和性。人们已经从酵母、爪蟾、人、拟南芥、小麦等物种中分离到了 *PABP* 基因<sup>[2-6]</sup>。目前发现的 Poly (A) 结合蛋白按照所在细胞内的定位可分为细胞质 PABP 和细胞核 PABP 两大类。细胞质 PABP 在真核生物中普遍存在, 包括 PABP1、tPABP、iPABP、PABP5、ePAB 和 ePABP2。Poly (A) 结合蛋白都是通过 RNA 识别模体 (RNA recognition motif) 与 Poly (A) 识别结合, 其中胞质 PABP 除 ePABP2 只具有 1 个 RRM 外, 其余都具有 4 个不同的 RRM。

青鳉是生活在中国、韩国、日本等国的一种淡水鱼, 这种鱼目前被作为研究脊椎动物的一种模式动物。笔者应用生物信息学手段克隆了青鳉的一种 *PABP* 基因全长 cDNA 序列, 并对其进行了生物信息学分析。

## 1 材料与方法

**1.1 *PABP* 基因的电子克隆** 对半滑舌鳎的 *ePABP2* 基因的核苷酸序列在青鳉 EST 数据库中进行同源性检索, 检索到 1 条同源性较高的青鳉 EST 序列, 再以该序列作为种子序列, 在青鳉 EST 库中检索到具有较高同源性或有部分重叠的 EST 序列, 将检索到的序列进行拼接, 形成连接体 (contig), 将其作为被检索序列再回到青鳉 EST 库中进行同源性检索, 重复以上过程, 直到连接体无法再延长, 最终得到 cDNA 序列片段。

**1.2 序列同源性分析及遗传进化树的绘制** 序列的拼接及分析: 根据测序的重叠区进行序列拼接, 从而得到完整的序列。序列拼接及编码序列的氨基酸翻译用 DNASTar 软件进行。序列的进化分析: 用 ClustalW 软件和 Mega 3.0 进行系

统发生分析。分析所需物种的 GenBank 登录号为: 半滑舌鳎 *ePABP2* (GQ229123)、斑马鱼 PABPN1 (NM\_213259)、非洲爪蟾 PABPN1 (NM\_001087250)、非洲爪蟾 *ePABP2* (NM\_001090949)、小鼠 PABPN1 (NM\_019402)、小鼠 *ePABP2* (NM\_001007462)、牛 PABPN1 (NM\_174569)、牛 *ePABP2* (XM\_869686) 和人 PABPN1 (NM\_004643)。

## 2 结果与分析

**2.1 青鳉一种 *PABP* 基因的全长 cDNA 序列的电子克隆** 对半滑舌鳎的 *ePABP2* 基因 (GQ229123) 的核苷酸序列在 <http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST> 站点进行青鳉 EST 数据库的 BLAST 检索, 通过不断的 BLAST 检索与拼接, 最终获得 1 127 bp 青鳉的一种 *PABP* 基因的全长 cDNA 序列, 编码 259 个氨基酸的蛋白质, 其中包括一个 72 个氨基酸的 RNA 识别模体, 蛋白质分子量为 29.5 KD (图 1)。

**2.2 同源性比较与分子进化分析** BLAST 分析发现, 青鳉 *PABP* 氨基酸序列与其他物种的 PABPN1 或者 *ePABP2* 氨基酸序列同源性较高。再利用 DNASTAR 软件包中的 MegAlign 软件, 将青鳉的 *PABP* 氨基酸序列与半滑舌鳎、斑马鱼、非洲爪蟾和小鼠的 PABPN 或 *ePABP2* 氨基酸序列进行同源比较。结果表明, 青鳉 *PABP* 与斑马鱼、非洲爪蟾和小鼠的 PABPN1 的同源性分别达到了 40.8%、38.8%、38.1% (图 2)。而与半滑舌鳎、非洲爪蟾和小鼠的 *ePABP2* 的同源性达到了 76.5%、42.2% 和 33.8%。可见, 青鳉 *PABP* 与半滑舌鳎的 *ePABP2* 同源性最高。

将青鳉的 *PABP* 蛋白的氨基酸序列与半滑舌鳎、斑马鱼、非洲爪蟾、小鼠、牛和人的 PABPN1 或 *ePABP2* 蛋白氨基酸序列进行 ClustalW 比对后, 利用 Mega 3.0 软件, 以邻位相接 (NJ) 法, 构建了系统树 (图 3)。由图 3 可知, 不同物种的 PABPN1 和 *ePABP2* 蛋白被明显区分开来。青鳉的 *PABP* 蛋白明显归为 *ePABP2*, 并且与半滑舌鳎的 *ePABP2* 蛋白亲缘关系最近, 这进一步证实了所获得青鳉的 *PABP* 基因属于 *ePABP2* 类型。

**基金项目** 滨州医学院科研启动基金 (BY2008KYQD03)。

**作者简介** 孙业盈 (1979-), 男, 山东泰安人, 讲师, 从事鱼类遗传学方面的研究。

**收稿日期** 2009-06-26

```

-91          gagatattcttctggtggcggtttgggtgagctgctgttctgtgtggoagatgoagatcctgggocgggggoc
1  atggetgaacatgata tggagtaoogotatttggagggcagggocattgagtgggcattatcaacogaagatocggaactgagggcoatoaaa
  M A E H D M E Y R Y L E G E A M S G H I N E D P E L M A I K
91  gcoaggggttcaggaggttggagatggaagaacagacggagagactgaaagagggggaagatgtgatgacagaggagatgctgagcagctoct
  A R V Q E L E M E E Q T E R L K E E E R C D A E E M L S S F
181 caacctgggctttotaaacatgactcctgaaagagaggttgatgagcagacaacagatcagctctatgtggggaaatgtggactatggagcc
  Q P G P F Y N M T P E E R M D A D N R S V Y V G N V D Y G A
271 aotgcagaogagotggagatocatttttaattggttgggtgtoactaacagagtaoagattctgtgtgacaggttctctgggtcactocataa
  T A D E L E I H F N G C G P V N R V T I L C D R F S G H P K
361 ggttgcctacattgaattctcogactgaaagcgtgcacaaagtctgttggctctgcatgaaacgatttgcagagggaagagctcottaag
  G P A Y I E P S D R S A A Q S A V G L H E T M F R G R V L K
451 gtgttgcotaaaagaacaaatagcagcagacttagoacccactgacagaggaggaactagaggggagtcacagcagcagagggaagagggagggc
  V L F K R T N M P G I S T T D R G G H R G S H S R G R G S G
541 caocgtcctcctagatatacaaaatgggtttogagcagatttgggtaccagtcacaagcagcagcagcacaacccccccatcctcattac
  E R P P R Y Q N G F R G R P R Y Q S T K P Q H Q P P E P Y Y
631 cagggagcatctgtggggaagagacagctggggctcactgactacaacgacagacacataaaagcgtacccatgtctcctcctcctcctcctcctc
  Q G A S V G K R C W G H T D Y N E C T S K R Y P C L L L I T
721 caaccctcagaggggtgggttcaggatcetaacggacagcactacocacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
  P P S E E V G S G S X G Q H Y P Q G R
811 ggggtgggatttttaggcagcaaaaggttttctcctccttggaaatcaaaactgaaaggtccaaactgctgagttttaaagttatgctgatgtga
901 aogcactgggcaacgcttgaactcttgatttagctgcatctgttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
991 tgttaaaacccagtgaaatgtgcaactcttcttactatgtgtaataaaataaaaacatttaaaaaaaaaa

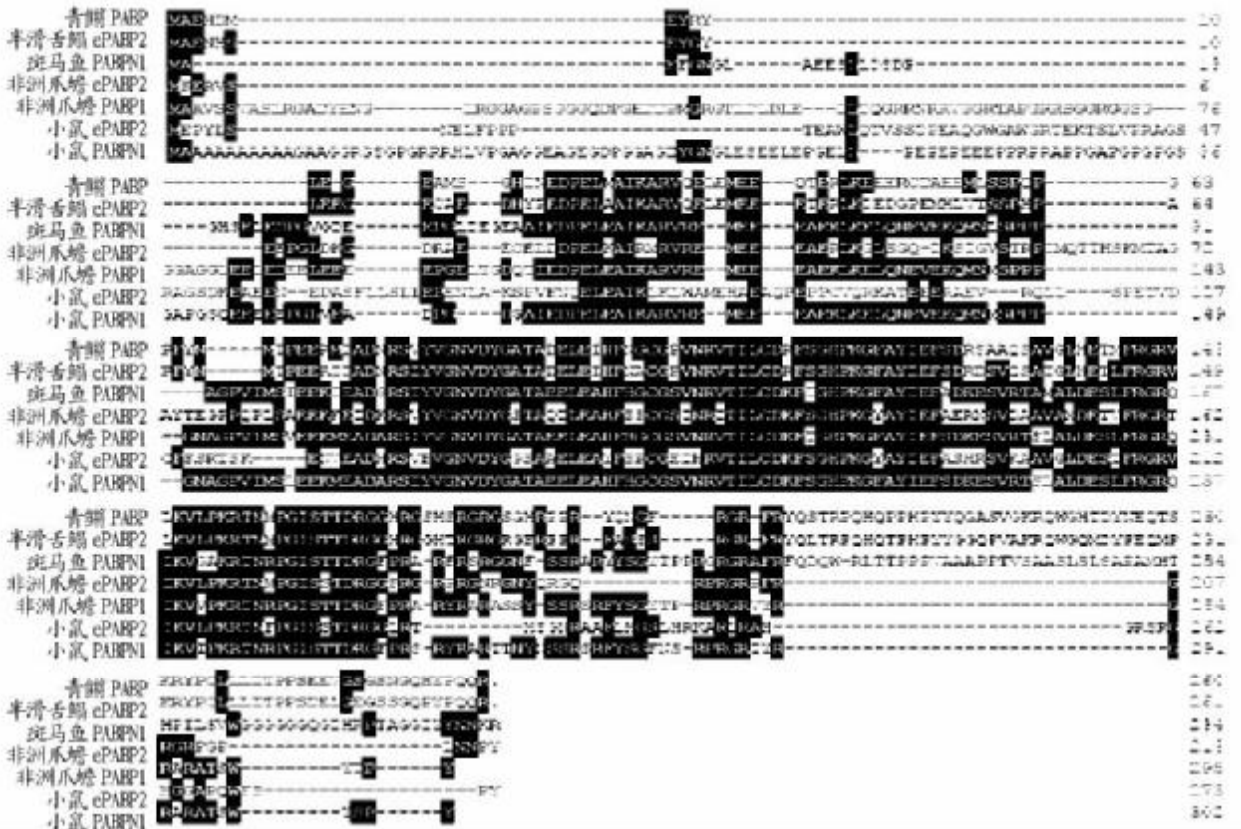
```

注:\_\_\_为 RNA 识别模体; \* 为终止密码子。

Note: \_\_\_ stands for the RNA recognition motif; \* stands for the termination.

图1 青鳉 PABP 基因的核苷酸及其推导的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the PABP gene of *Oryzias latipes* code



注:阴影为相同的氨基酸序列, - 为序列比较时产生的序列间的空隙。

Note :The shadow parts stand for the same amino acid sequences; - stands for the sequence gap of the sequence alignment.

图2 青鳉 PABP 蛋白的氨基酸序列与其他物种的 PABPN1 或 ePABP2 蛋白的氨基酸序列比较

Fig.2 Comparison of amino acid sequence between the PABP protein and PABPN1 of other species or ePABP2 protein of *Oryzias latipes*

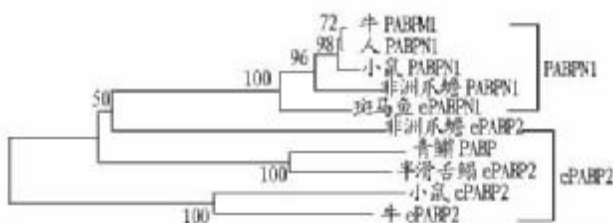
### 3 讨论

在早期发育过程中,卵母细胞中储存大量母源性 mRNA,以备在合子基因激活前合成发育所需的蛋白质。母源性 mRNA 的翻译起始和沉默受到严格的调控,该调控过程需要 PABP 的参与。Voeltz 等在爪蟾中发现一种新的 Poly(A) 结合蛋白,命名为 ePAB,在爪蟾 VI 期卵母细胞以及早期胚胎中表达<sup>[7]</sup>。2004 年,Seli 等利用 RT-PCR 和原位杂交技术检测到 ePAB 的 mRNA 存在于小鼠 PI、MII 期卵母细胞和 1、2

(下转第 12427 页)

图3 根据 PABPN1 或 ePABP2 蛋白氨基酸序列使用邻接法构建的系统进化树

Fig.3 The phylogenetic tree constructed by the amino acid sequences of PABPN1 or ePABP2



的。而植物 MBF1s 参与多种胁迫反应,在农作物中超表达 MBF1 可以调节多种信号转导途径和激活多种防御因子的表达,这就比单纯的转入一个抗性基因更能增强农作物的抵抗力。MBF1 为培育新的高抗性的转基因作物提供了新的路径,但是目前对 MBF1 的作用机制和功能还不是特别清楚,因此加强对 MBF1 的研究,揭示它在基因表达中的具体作用和调节机制有很重要的意义。

#### 参考文献

- [1] TAKEMARU K, LI F Q, UEDA H, et al. Multiprotein bridging factor 1 (MBF1) is an evolutionarily conserved transcriptional coactivator that connects a regulatory factor and TATA element-binding protein[J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94: 7251 - 7256.
- [2] TAKEMARU K, HARASHIMA S, UEDA H, et al. Yeast coactivator MBF1 mediates GCN4-dependent transcriptional activation[J]. Mol Cell Biol, 1998, 18: 4971 - 4976.
- [3] BRENDDEL C, GELMAN L, AUWERX J. Multiprotein bridging factor-1 (MBF-1) is a coactivator for nuclear receptors that regulate lipid metabolism[J]. Mol Endocrinol, 2002, 16: 1367 - 1377.
- [4] LIU Q X, JINDRA M, UEDA H, et al. Drosophila MBF1 is a co-activator for tracheae defective and contributes to the formation of tracheal and nervous systems[J]. Development, 2003, 130: 719 - 728.
- [5] KABE Y, GOTO M, SHIMA D, et al. The role of human MBF1 as a transcriptional coactivator[J]. J Biol Chem, 1999, 274: 34196 - 34202.
- [6] OZAKI J, TAKEMARU K, IKEGAMI T, et al. Identification of the core domain and the secondary structure of the transcriptional coactivator MBF1[J]. Genes Cells, 1999, 4: 415 - 424.
- [7] KONING B DE, BLOMBACH F, WU H, et al. Role of multiprotein bridging factor 1 in archaea: bridging the domains? [J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37: 52 - 57.
- [8] TSUDA K, YAMAZAKI K. Structure and expression analysis of three subtypes of *Arabidopsis* MBF1 genes[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1680: 1 - 10.
- [9] LI F Q, UEDA H, HIROSE S. Mediators of activation of fushi tarazu gene transcription by BmFTZ-F1[J]. Mol Cell Biol, 1994, 14: 3013 - 3021.
- [10] TSUDA K, TSUJI T, HIROSE S, et al. Three *Arabidopsis* MBF1 homologs with distinct expression profiles play roles as transcriptional co-activator[J]. Plant Cell Physiol, 2004, 45: 225 - 231.
- [11] ARCE D P, TONÓN C, ZANETTI M E, et al. The potato transcriptional co-activator StMBF1 Is Up-regulated in response to oxidative stress and interacts with the TATA-box binding protein[J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 39: 355 - 360.
- [12] HOMMEL M, KHALIL-AHMAD Q, JAIMES-MIRANDA F, et al. Over-expression of a chimeric gene of the transcriptional co-activator MBF1 fused to the EAR repressor motif causes developmental alteration in *Arabidopsis* and tomato[J]. Plant Science, 2008, 175: 168 - 177.
- [13] TOJO T, TSUDA K, YOSHIZUMI T, et al. *Arabidopsis* MBF1s control leaf cell cycle and its expansion[J]. Plant and Cell Physiology, 2009, 50: 254 - 264.
- [14] KIM M J, LIM G H, KIM E S, et al. Abiotic and biotic stress tolerance in *Arabidopsis* overexpressing the Multiprotein bridging factor 1a (MBF1a) transcriptional coactivator gene[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 354: 440 - 446.
- [15] SUZUKI N, RIZHSKY L, LIANG H, et al. Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor 1c[J]. Plant Physiol, 2005, 139: 1313 - 1322.
- [16] ZANETTI M E, CHAN R L, GODOY A V, et al. Homeodomain-leucine zipper proteins interact with a plant homologue of the transcriptional co-activator multiprotein bridging factor 1[J]. J Biochem Mol Biol, 2004, 37: 320 - 324.
- [17] 张毅, 张岗, 董艳玲, 等. 条锈菌诱导的小麦 MBF1 转录辅激活因子基因的克隆及其特性分析[J]. 作物学报, 2009, 35(1): 11 - 17.
- [18] SUZUKI N, BAJAD S, SHUMAN J, et al. The transcriptional co-activator MBF1c is a key regulator of thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. J Biol Chem, 2008, 283: 9269 - 9275.
- [19] GODOY A V, ZANETTI M E, SEGUNDO B S, et al. Identification of a putative *Solanum tuberosum* transcriptional coactivator up-regulated in potato tubers by *Fusarium solani* f. sp. *Eumartii* infection and wounding[J]. Physiol Plant, 2001, 112: 217 - 222.
- [20] ZANETTI M E, BLANCO F A, DALEO G R, et al. Phosphorylation of a member of the MBF1 transcriptional co-activator family, StMBF1, is stimulated in potato cell suspensions upon fungal elicitor challenge[J]. J Exp Bot, 2003, 54: 623 - 632.
- [21] RIZHSKY L, LIANG H, MITTLER R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco[J]. Plant Physiol, 2002, 130: 1143 - 1151.
- [22] MATSUSHITA Y, MIYAKAWA O, DEGUCHI M, et al. Cloning of a tobacco cDNA coding for a putative transcriptional coactivator MBF1 that interacts with the tomato mosaic virus movement protein[J]. J Exp Bot, 2002, 53: 1531 - 1532.
- [23] DRAGONI I, MARIOTTI M, CONSALEZ G G, et al. EDF-1, a novel gene product down-regulated in human endothelial cell differentiation[J]. J Biol Chem, 1998, 273: 31119 - 31124.
- [24] JINDRA M, GAZIOVA I, UHLIROVA M, et al. Coactivator MBF1 preserves the redox-dependent AP-1 activity during oxidative stress in *Drosophila*[J]. EMBO, 2004, 23: 3538 - 3547.
- [25] LIU Q X, NAKASHIMA-KAMIMURA N, IKEO K, et al. Compensatory change of interacting amino acids in the coevolution of transcriptional co-activator MBF1 and TATA-box-binding protein[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24: 1458 - 63.
- [26] LIU Y F, QIU D W, ZENG H M, et al. Detection for transcriptional activity of *Alternaria tenuissima* protein elicitor in yeast two-hybrid system[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(1): 64 - 66.
- [27] 孙亮, 金锋, 王沂, 等. 核辅激活因子 PGC-1 作用分子机制的研究进展[J]. 遗传, 2005, 27(2): 302 - 308.

(上接第 12424 页)

细胞胚胎中,而在 4 细胞以后检测不到 mRNA<sup>[8]</sup>。更重要的是, *ePAB* 的 mRNA 只特异性地表达于小鼠的卵巢、睾丸和早期胚胎中,而在其他体细胞中并不存在。相反地, PABP1 在小鼠 8 细胞后开始大量表达,而且普遍表达于体细胞中。由此可见, *ePAB* 参与了爪蟾和小鼠配子发生以及早期胚胎发育过程中的基因表达调控,特别是母源性 mRNA 的翻译激活和沉默的调控。笔者通过电子克隆的方法获得了青鳞的一种 *PABP* 基因,并通过生物信息学的方法证明与其他物种的 *ePABP2* 基因同源,为进一步利用青鳞这一模式生物研究 *ePABP2* 基因在鱼类早期胚胎发育中的作用提供了基础。

#### 参考文献

- [1] KENAN D F, QUERY C C, KEENE J D. RNA recognition: towards identifying determinants of specificity[J]. Trends Biochem Sci, 1991, 16: 214 - 225.
- [2] SACHS A B, BOND M W, KORNBURG R D. A single gene from yeast for both nuclear and cytoplasmic polyadenylate-binding proteins: domain structure and expression[J]. Cell, 1986, 45: 827 - 835.
- [3] LEFRERE V, VINCENT A, AMALRIC F. *Drosophila melanogaster* poly (A)-binding protein: cDNA cloning reveals an unusually long 3'-untranslated region of the mRNA, also present in other eukaryotic species[J]. Gene, 1990, 96: 219 - 225.
- [4] GRANGE T, DESA C M, ODDOS J, et al. Human mRNA polyadenylate binding protein: evolutionary conservation of a nucleic acid binding motif[J]. Nucleic Acids Res, 1987, 15 (12): 4771 - 4787.
- [5] BELOSTOTSKY D A, MEAGHER R B. Differential organ-specific expression of three poly (A)-binding protein genes from *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 6683 - 6690.
- [6] HANH L E, CHANG S C, TANGUAY R L, et al. The wheat poly (A)-binding protein functionally complements pab1 in yeast[J]. Eur J Biochem, 1997, 243: 350 - 357.
- [7] VOELTZ G K, ONGKASUWAN J, STANDART N, et al. A novel embryonic poly(A) binding protein, ePAB, regulates mRNA deadenylation in *Xenopus* egg extracts[J]. Genes Dev, 2001, 15: 774 - 788.
- [8] SELI E, LALIOTI M D, FLAHERTY S M, et al. An embryonic poly (A)-binding protein (ePAB) is expressed in mouse oocytes and early preimplantation embryos[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 367 - 372.