

文章编号: 1000-0615(2001)05-0398-04

皱纹盘鲍肌动蛋白基因启动子的克隆和序列分析

张志峰, 茅云翔, 潘 洁, 汪小龙, 包振民

(青岛海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要:从皱纹盘鲍雌性个体的足部肌肉提取总 DNA 后,通过聚合酶连式反应(PCR)技术扩增得到一个扩增产物。经克隆、筛选、确定重组子产物。测序得到了长度为 511bp 的启动子片段。分析测序结果发现,皱纹盘鲍肌动蛋白基因启动子 DNA 序列与目前已知的红鲍相应序列的相似度为 95%;GC 碱基含量为 38.93%,较红鲍的低(59.2%);所得序列含有高度保守的基本表达调控元件,即一个 CAAT 框和四个 TATA 框。

关键词:皱纹盘鲍;肌动蛋白基因;启动子;序列分析

中图分类号:Q78

文献标识码:A

Cloning and sequence analysis of actin gene promoter in *Haliotis discus hannai*

ZHANG Zhi-feng, MAO Yun-xiang, PAN Jie, WANG Xiao-long, BAO Zhen-min

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract:Total DNA from foot muscle of female individual in *Haliotis discus hannai* was extracted by routine method. Actin gene promoter was amplified by PCR technique. A recombinant was obtained after cloning and screening. Its length is 511 bp. The result shows after the sequence is analysed: The homologous series of nucleotides sequence between *Haliotis discus hannai* and *Haliotis rufescens* is 95%. The GC base content of *Haliotis discus hannai* is 38.93%. This value is 59.2% lower than that of *Haliotis rufescens*. The sequence includes expression of control elements whose high level of conservation can be seen, i. e. four TATA boxes and one CAAT box.

Key words: *Haliotis discus hannai*; actin gene; promoter; sequence analysis

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)归于软体动物门(Mollusca),腹足纲(Gastropoda),前鳃亚纲(Prosobranchia),原始腹足目(Archaeogastropoda),鲍科(Haliotidae),鲍属(Haliotis),它是一种比较大型的海洋腹足类动物。

鲍是海产品中的珍品之一,具有很高的经济价值,从而受到国内外海水养殖者的广泛重视。由于鲍生长缓慢和易患病等原因,严重地制约了经济效益的发挥。为探讨和解决鲍生长慢的问题,目前已经开展了一些有关鲍的转基因研究^[1-3]。但是外源基因整合和表达的效率都较低,主要原因是缺乏鲍内源

收稿日期:2000-10-16

基金项目:国家 863 青年基金项目(863-819-Q-05)

第一作者:张志峰(1964-),女,山东青岛人,副教授,博士,从事海洋动物发育遗传学研究。Tel:0532-2031647, E-mail:zzfp107@mail.ouqd.edu.cn

通讯作者:包振民(1961-),男,山东烟台人,教授,博士。从事海洋生物技术研究。Tel:0532-2032059, E-mail:zmbao@ouqd.edu.cn

启动子。据此我们以中国特有种皱纹盘鲍为材料,通过专一性引物的特异性扩增筛选出肌动蛋白基因的启动子区,为今后构建相应的表达载体和转基因研究打下基础,也为鲍的分子生物学研究提供储备资料。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂和仪器

皱纹盘鲍购自青岛市四方路市场,为雌性个体(壳长 5.5cm)足部肌肉。核糖核酸酶(RNA 酶)、蛋白酶 K、10× 缓冲液、氯化镁、脱氧核糖核酸聚合酶(Taq 酶)和寡脱氧核苷三磷酸(oligo-deoxyrinucleotide dNTP)均购于上海生物工程公司,载体质粒 DNA(PUC18)、EcoRI、BamHI 连接酶购自北京华美生物工程公司,核酸分子量标准(λ DNA EcoR I + Hind III)购自青岛海泰生物技术公司,引物由上海生物工程公司合成,所用其它药品均为分析纯。采用多聚酶链式反应(PCR)扩增仪进行 PCR 扩增,DNA 序列由上海基康生物工程公司测定。

1.2 方 法

皱纹盘鲍总 DNA 的提取是在常规方法的基础上略加修改^[4]。PCR 引物设计和选用是在已报道的红鲍肌动蛋白基因启动子序列的基础上^[5],采用 PCR 软件设计程序筛选获得一对引物,即正向引物为:5'CGGATTCCTTACTTCTGGGTCCAATCC,反向引物为:5'CGGGATCCCCTGAAAGCGGATGCAATATCG,其中划线的序列为加入的保护碱基和 EcoR I 及 BamH I 酶切位点。PCR 循环参数为:94℃(热启动) 5 min;94℃ 1min,55℃ 1min,72℃ 1min,30 个循环;72℃ 15mins。PCR 扩增产物经低熔点琼脂糖法回收后,连入由 EcoRI 和 BamHI 酶切 PUC18 载体产生的粘端内,经蓝白斑反应确定重组子,PCR 扩增检测确认后测序。

2 结果与讨论

2.1 DNA 的提取

采用蛋白酶 K 法提取的 DNA 有很好的完整性,此法拖尾区域小,所提取的 DNA 经与 Marker 比较,目测每次的含量均在 $50\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 以上。这些都为保证有效的进行扩增奠定了基础。从我们的试验结果来看,将皱纹盘鲍足部肌肉切成薄片,直接于 STE 液中剪碎,与在液氮中处理比较,前者操作简便(肌肉在液氮中非常难于磨碎),效果也比在液氮中要好。

2.2 PCR 扩增结果

将上述方法得到的皱纹盘鲍总 DNA,用所设计的一对引物进行 PCR 扩增后,得到了一个明显的扩增带,分子量约为 510bp(图 1)。在本次 PCR 扩增试验中,我们固定 dNTP、引物和 Taq 酶的浓度以及循环参数,通过调整模板 DNA 和 Mg^{2+} 的浓度,得出在 Mg^{2+} 浓度为 $3.3\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 至 $3.7\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间,模板浓度为 $0.04\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 至 $0.125\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 之间,引物浓度为 $1\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,dNTP 为 0.2mmol ,Taq 酶为 $2\text{单位}\cdot 100\mu\text{L}^{-1}$ 时,均可得到理想的 PCR 扩增带。用此 PCR 产物直接测序,结果见图 2。

2.3 PCR 产物的克隆

PCR 产物经低熔点琼脂糖回收后,采用 EcoRI

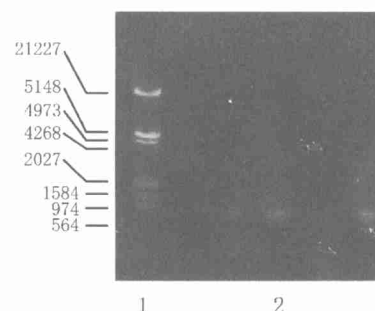


图 1 PCR 扩增

Fig.1 Amplification of PCR

1. λ DNA EcoR I + Hind III marker,

2. PCR product

和 BamHI 双酶切,再连入具相同酶切位点的 PUC 18 载体中。连接产物转化入感受态的大肠杆菌中,通过蓝白斑反应,初步得到了数个白斑菌落重组子。对它们进行扩增培养提取质粒后,电泳进一步确定重组子产物(图 3),测序后,发现与 PCR 产物序列相同。

```

1   TTGTTCTCAT CAAGGCGTCT TTTATACATA CCCCATTAGT AGGCGACCAA TCATATTGTG
61  TTTGAGAATA ATAGAAACGT AACGACTGTA ATTGTAATAA ATATACCCTT CTAATGTATT
121 ATATTGCATA ACAGCCTTTC TTGGGTACAT GTGGAAGAAT GTGTCACAGT CGGGGGTCAT
181 CTGCACTGAT CTCTCTTCC CCTACAAGTA AGTACCCCCT ACCCCCGTTC CCGAAGAAAG
241 GACAACGCCA CGTGGTATTG TGCCGGAGAA TGGGGAAGCG CTTCTCGAGC TGACGAGCAT
301 GAATGCAAGA ATATGATACT GGTAAATAAT TAACTTAAAT GCATATATCA ACATTATTGG
361 GAAATGCATA GATTCTAAAA TCCATACAAC GCTTACTCCT CATCAGTTAT AAAGCATTGT
421 AAAGTTATAT CCAAACCTCC TAGAATAAAT GCAGTGTGTA ATAAGGATTG GACCCATAAG
481 TAAGAGTTCC GACCGANAAN TANNAATTCC G

```

图 2 皱纹盘鲍肌动蛋白基因启动子序列(511bp)

Fig.2 Sequence of actin gene promoter in *Haliotis discus hannai*

2.4 测序及序列分析

将所得的皱纹盘鲍肌动蛋白基因启动子序列与目前仅有的红鲍的同源序列进行比较(图 4, 见下页)。结果显示,肌动蛋白基因启动子的保守性相当高,皱纹盘鲍与红鲍完全不同的核苷酸极少,两者的相似性为 95%,GC 碱基含量在皱纹盘鲍为 38.93%,较红鲍的 59.2%低。

真核生物的启动子是多部位结构,其中绝大多数启动子都包括有基本表达调控元件,如帽子位点(Cap site)、TATA 框和 CAAT 框。TATA 框是 RNA 聚合酶的结合位点,它决定了转录起始点的选择,也是基因正确表达所必需的。CAAT 框可能控制着转录起始的频率^[6]。红鲍肌动蛋白启动子序列中含有一个 TATA 框、三个 CAAT 框。从本实验所获得的皱纹盘鲍肌动蛋白基因启动子的序列来看,既有 TATA 框(四个)也有 CAAT 框(一个),说明此启动子具有启动肌动蛋白基因活性的可能。对于此启动子的进一步功能研究正在进行中。

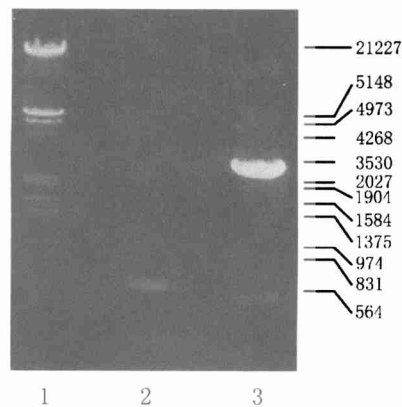


图 3 PCR 检测克隆

Fig.3 Check of clone by PCR

1. λ DNA EcoR I + Hind III marker;
2. PCR product;
3. PUC18-PCR product + EcoR I + BamH III

参考文献:

- [1] Powers D A, Kirby V L, Cole T, et. al.. Electroporation as an effective means of introducing DNA into abalone (*Haliotis rufescens*) embryos [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1995, 4 (4): 369 - 375.
- [2] 包振民,胡景杰. 精子载体法在海产贝类转基因研究中的应用[A]. 海洋生物技术研究新进展[C]. 北京:海洋出版社,1999.45 - 57.
- [3] Bao Z M, Hu J J. Gene transfer and zygotes fusion breeding a fast growing abalone[A]. Eighteenth International Congress of Genetics[C]. 1998. 217.
- [4] 金冬燕. 分子克隆[M]. 北京:科学出版社,1992.
- [5] Gomez-Chiarri M, Power D A. Isolation and characterization of an actin promoter from the red abalone (*Haliotis rufescens*) [J]. *J Mar Biotechnol*, 1999, 3: 269 - 278.
- [6] 孙乃恩,孙东旭,朱德煦. 分子遗传学[M]. 南京:南京出版社,1999.195 - 198.

```

                                *
Hdh: 13  aggcgtctttatacataccccattagtaggcgacccaatcatattgtgtttgagaataat 72
          |||
Hr : 833 aggcgtctttatacataccccattagtaggcgaccaatcagattgtgtttgagaataat 774

          * *
Hdh: 73  agaaacgtaacgactgtaattgtaataaatatacccttctaagtgatatattgcataac 132
          |||
Hr: 773  agaaacgtaaccatgtgaattgtaataaatatacccttctaagtattatattgcataac 714

          * * * *
Hdh: 133 agcctttcttgggtacatgtggaagaatgtgtcacagtcgggggcatctgcactgatct 192
          |||
Hr: 713  aacctttcatgtgtacatgtggaagaatgtgtcacagtcggggggatctgcactgatct 654

          * *
Hdh: 193 ctctttcccctacaagtaagtacccccacccttcccgaagaaggacaacgccacg 252
          |||
Hr: 653  ctctttcccctaagtaagtacccccacccttcccgaagcaaggacaacgccacg 594

          * *
Hdh: 253 tggatattgtgc-cggagaatggggaagcgcttctcgagctgacgagcatgaatgcaagaa 311
          |||
Hr: 593  tggatggtgcgcgggagaatggggaagcgcttctcgagctgacgagcatgaatgcaagaa 534

          * * * *
Hdh: 312 tatgatactggtaataaattaacttaaatgcatatatcaacattattgggaaatgcatag 371
          |||
Hr: 533  tgtgatgctggtaataaattaagttaaatgaatatatcagcattattgggaaatgcatag 474

          *
Hdh: 372 attctaaatccatacaacgcttactcctcatcagttataaagcattgtaaagttatatc 431
          |||
Hr: 473  attctaaatccatacaacgcttactgctcatcagttataaagcattgtaaagttatatc 414

          * * *
Hdh: 432 caaacttctagaataaatgcagtggtgtaataaggattggaccataagtaa 483
          |||
Hr: 413  caaacttctggaagaaatgcagtggtgtaataaggattggacccaagtaa 362

```

图 4 皱纹盘鲍肌动蛋白基因启动子 DNA 序列与红鲍相应序列比较

Fig.4 DNA sequence comparison of actin gene promoter between *Haliotis discus hannai* and *Haliotis refusents*

(* 示皱纹盘鲍和美国红鲍不同的核苷酸。TATA 为 RNA 聚合酶结合位点。CAAT 控制转录起始的频率)。