

鹅 *bcl-2* 基因部分 cDNA 的克隆与序列分析

陈秀萍^{1,2}, 姜勋平^{1*}, 丁家桐²

(1. 华中农业大学动物科技学院, 武汉 430070; 2. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009)

关键词: 鹅; *bcl-2* 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S835.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)11-1228-04

细胞凋亡是基因活动引起的级联反应的结果。现已发现大约有 30 多种分子专门参与细胞凋亡调控, 其中 *bcl-2* 家族是一类主要的细胞内调控物质, 由相应的 *bcl-2* 基因家族编码。自 Tsujimoto 等首先克隆人 *bcl-2* 基因以来, 随后的一系列研究发现 *bcl-2* 蛋白的生理功能主要是阻遏细胞凋亡、延长细胞寿命^[1], 这些研究主要集中于人^[2]、仓鼠^[3]、绵羊、奶牛以及鸡^[4]等, 而尚未见鹅 *bcl-2* 基因的研究报道。本研究用 RT-PCR 法从鹅卵巢组织中扩增出 *bcl-2* 基因的部分序列, 进行克隆测序, 并与其它动物的 *bcl-2* 相应序列进行比对分析, 揭示该基因在物种中的差异, 并为以后的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验对象 成年母鹅 1 只, 取新鲜卵巢组织液氮保存备用。

1.1.2 试剂 RNA 提取试剂 Trizol、逆转录试剂盒购自 Promega 公司; *Taq* DNA 多聚酶及其它试剂均购自晶美生物工程公司; 大肠杆菌 DH5 α 本室保存; 克隆载体 pMD18-T、凝胶回收试剂盒购自 TaKaRa。

1.2 方法

1.2.1 鹅卵巢组织总 RNA 提取与反转录 每 100 mg 卵巢组织加 1 mL Trizol 试剂, 提取总 RNA, DEPC 水溶解后, 立即按逆转录试剂盒的说明书进行反转录。反转录反应体系为: 10 μ L 总 RNA (约 1 μ g), Oligod(T)₁₈ 2 μ L, 于 70 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 然后立

即置于冰水混合物中退火结合 2~ 3 min, 再加入 5 \times Buffer 5 μ L, 10 mmol/L dNTP 1.25 μ L, 40 U/ μ L Rnasin 0.5 μ L, 200 U/ μ L MMLV 酶 1 μ L, 加 DEPC 水至 25 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 延伸 90 min, 反转录成 cDNA 第一条链, 然后置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 PCR 循环 参考 GenBank 报道的鸡 [gi: 23821533] 和其它动物的 *bcl-2* 基因序列, 利用 Primer5.0 和 Oligo6.0 软件优化, 设计 1 对引物, 其上游序列为: 5'-CTGAGCCTGGTTCTGGTGGG-3', 下游序列为: 5'-ATGATGCGATGGCACCAC TG-3'。引物由武汉 Sunbio 公司合成。

以合成的 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增, 反应体系为: 模板 1 μ L, 10 \times buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 2 mmol/L dNTP 2.5 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 2.5 μ L, 1 U/ μ L *Taq* 酶 1 μ L, 加双蒸水补至 25 μ L。

反应程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 65 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 进行 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 切下目的片段, 用凝胶回收试剂盒回收。

1.2.3 PCR 产物的克隆与鉴定 取定量后的目的片段与 pMD18-T 克隆载体按 1:3 比例混合, 16 $^{\circ}$ C 连接 4 h。连接产物转化 DH5 α , 接 Amp 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。挑取单个白色菌落, 少量培养, 然后用 PCR 法鉴定重组质粒。

1.2.4 序列测定与分析 PCR 鉴定正确后, 对其进行测序鉴定。测序由上海华诺生物科技有限公司完成。对获得的 cDNA 序列在 GenBank 上进行 Blast 同源性分析。

2 结果

2.1 *bcl-2* 基因扩增

提取的总 RNA 按上述条件进行 RT-PCR 扩

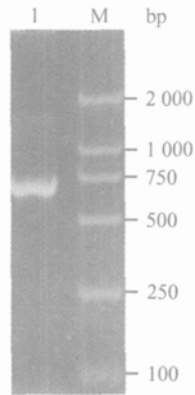
收稿日期: 2004-11-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30300253); 中国博士后科学基金项目(2003033469)

作者简介: 陈秀萍(1980-), 女, 博士生, 主要从事胚胎生物工程与动物繁殖的研究

* 通讯作者: 姜勋平, E-mail: xpjiang@mail.hzau.edu.cn

增, 得到的扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 在约 700 bp 处有 1 条特异性 DNA 条带, 与引物设计的



1. PCR 扩增产物; M. Marker DL-2000

图 1 鹅 *bcl-2* 基因 PCR 产物电泳图

Fig. 1 PCR products electrophoresis of the goose *bcl-2* gene

2.2 重组质粒 pMD18-T-*bcl-2* 的鉴定

对挑取的白色单菌落进行 PCR 鉴定, 鉴定结果如图 2, 从阳性克隆中, 挑选任一进行序列测定。

2.3 *bcl-2* 基因测序及序列比对

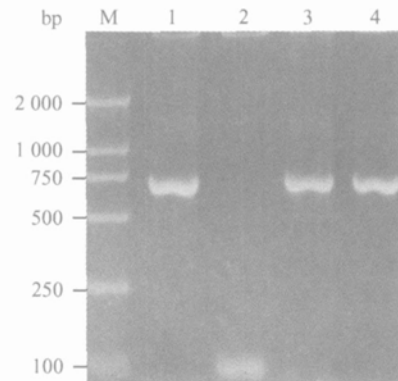
以 pMD-18T 载体上的 M13 Primers 进行 DNA 测序, 得到鹅 *bcl-2* 基因部分 cDNA 序列。对获得的序列在 GenBank 上进行 Blast 对比分析, 发现该序列主要是 *bcl-2* 基因的部分蛋白质编码区。该编码区与已报道动物的 *bcl-2* 具有较高的同源性, 但是非编码区只与鸡的非编码区高度同源, 而与哺乳动物的对应编码区同源性极低。经 Blast 分析, 扩增片段序列与鸡 *bcl-2* 基因序列同源性为 92.49% (见图 3)。

根据已发表动物的 *bcl-2* 基因序列, 推导出 *bcl-2* 部分氨基酸序列, 发现鹅与鸡的完全相同, 与人^[3]和大鼠(rat) [gi: 8392973] 分别有 5 个和 3 个氨基酸的差异(见图 4)。

3 讨论

文献报道动物的 *bcl-2* 基因一般含有 3 个外显子和 2 个内含子, 其中第 I 个外显子不编码, 外显子 II、III 被一很长的内含子隔开。本试验扩增出的片段为外显子 3 上的部分区域。该基因经不同的剪接方式形成 2 种不同的蛋白质产物, 即 *bcl-2 α* 和 *bcl-2 β* , 但主要是 α 形式^[3]。不同物种 *bcl-2 α* 所含的氨基酸数目略有差异, 例如鸡 233 个、人 239 个、大鼠 236 个^[4], 该蛋白 C 端有一个由 19 个氨基酸构成的

预期扩增结果相似(如图 1)。



1~ 4. 鉴定的 PCR 产物; M. Marker DL-2000

图 2 阳性克隆 PCR 鉴定图

Fig. 2 PCR analysis for the recombinant

疏水序列, 为跨膜部分。鸡和哺乳动物 *bcl-2* 蛋白在 C- 端和 N- 端区域是高度保守的, 但中间位置的同源性较差。

本研究通过 RT-PCR 技术, 得到了鹅 *bcl-2* 基因的部分 cDNA 序列, 其中 1~ 135 为编码区的部分序列, 136~ 719 为非编码区, 这为分离克隆鹅 *bcl-2* 全基因提供了可能。通过 blast 分析, 发现该扩增序列与鸡的相应区域的核苷酸同源性为 92.49%, 进一步的分析发现该基因的部分编码区与其他物种具有较高的同源性(见图 4), 而非编码区的序列与鸡同源性十分高, 但与至今所报道的哺乳动物相应区域同源性极低, 而人和鼠相应的非编码区却很相似, 都存在一很长的 CA 串联重复序列(见图 3)。这说明相似物种同一基因在进化过程中更加保守。

本研究首次报道了鹅 *bcl-2* 基因部分 cDNA 序列, 其意义有: (1) 在畜禽繁殖过程中卵泡闭锁是影响畜禽繁殖率的主要原因。众所周知, 鹅的产蛋量很低, 如果能使 *bcl-2* 基因在卵巢中定位表达(如基因治疗), 使其多排卵, 那么在提高其产蛋率上将有一定的应用前景; (2) 有利于研究该基因在鹅上的分子调控机制。据报道, 非翻译区的遗传改变(碱基突变)引起了 *bcl-2* 的过度表达^[5], 本研究扩增出的部分非翻译区序列, 可为遗传突变分析提供依据; (3) 为鹅不同品种间 DNA 多态性的研究奠定基础, 从而有利于鹅的选种选育。

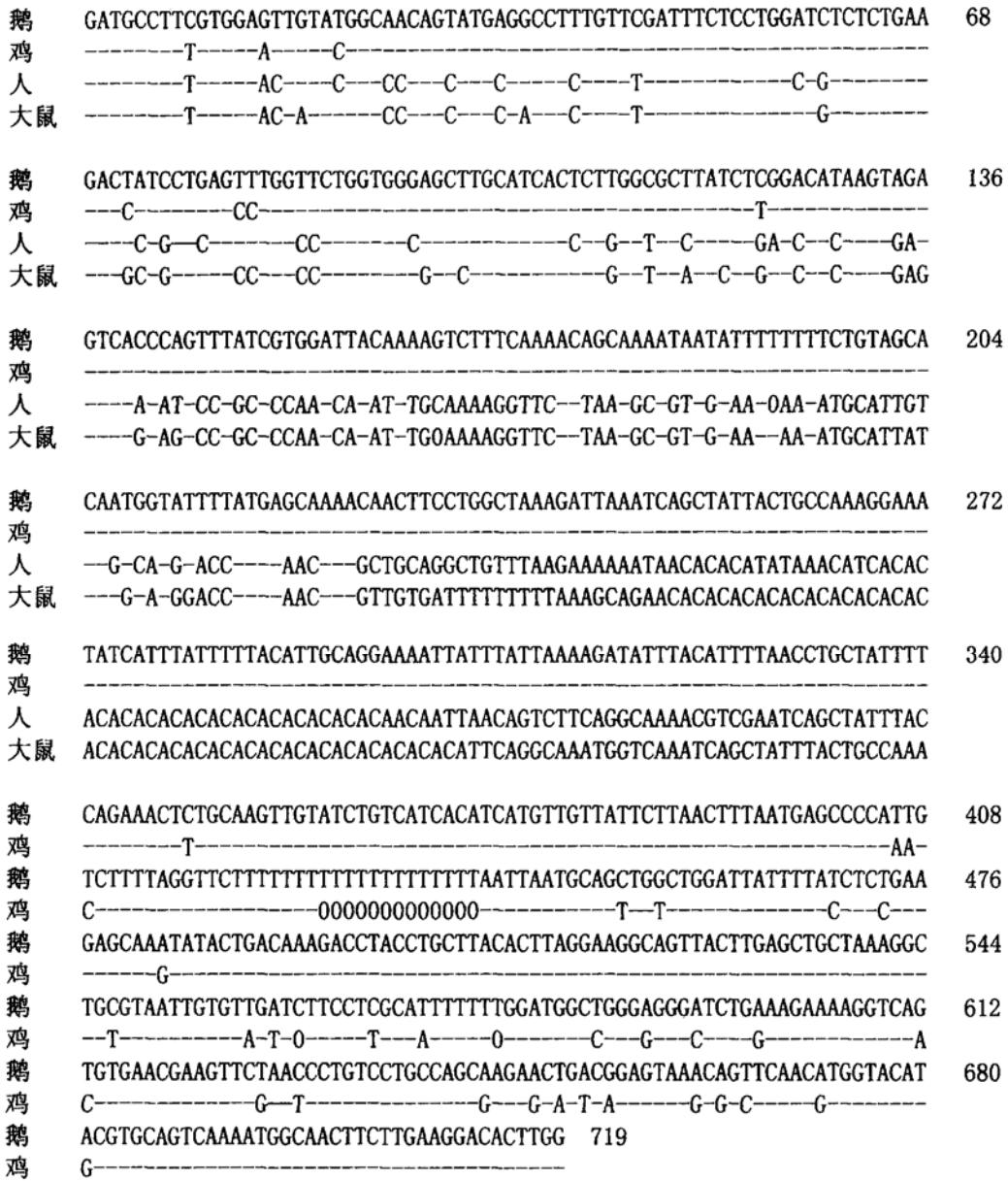


图 3 不同物种 bcl-2 基因部分核苷酸序列的同源性比较 (其中 0 表示缺少相应的碱基)

Fig. 3 Homologous comparison of partial nucleotide sequences of bcl-2 in different species

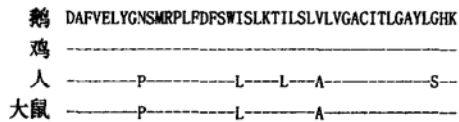


图 4 不同物种 bcl-2 基因部分氨基酸序列的同源性比较

Fig. 4 Homologous comparison of partial amino acid sequences of encoding bcl-2 in different species

参考文献:

[1] 赵卫红, 寿好长, 闫福岭. 细胞凋亡 [M]. 河南医科大学出版社, 1997: 19~ 22.

[2] Tsujimoto Y, Croce C. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(14): 5 214~ 5 218.

[3] Maja T, Markus C, Bernd K. Cloning and functional analysis of cDNA encoding the hamster bcl-2 protein [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 275: 899~ 903.

[4] Eguchi Y, Ewert D, Tsujimoto Y. Isolation and characterization of the chicken bcl-2 gene: expression in a variety of tissues including lymphoid and neuronal or-

gans in adult and embryo [J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(16): 4 187~ 4 192.

latory element in the 5'-untranslated region of the bcl-2 gene[J]. *FEBS Letters*, 1997, 406: 31~ 32.

[5] Ines K, Renate W, Peter P, et al. Analysis of a regur-

Partial Cloning and Sequence Analysis of the bcl-2 Gene of Goose

CHEN Xiur-ping^{1,2}, JIANG Xur-ping^{1*}, DING Jiar-tong²

(1. *College of Animal Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

2. *Animal Science and Technology College of Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)*

Abstract: In order to amplify the partial bcl-2 gene of goose, we designed a pair of primers according to the reported chicken bcl-2 gene sequence in the GenBank, and obtained the gene by reverse transcript-polymerase chain reaction (RT-PCR). Then the gene was cloned into pMD-18T vector and identified by PCR. The nucleotide and amino acid sequences of goose partial bcl-2 gene were compared with the counterpart sequences of chicken, and the nucleotide homology was 92.49%. This is the first report of bcl-2 partial nucleotide sequence of goose.

Key words: goose; bcl-2 gene; cloning; sequence analysis

* Corresponding author

2006 年互登启事

期刊名称	邮发代号	刊期	年定价/元	编辑部地址	邮编	联系电话
中国动物检疫	24-112	月刊	60.00	青岛市南京路 369 号农业部动物检疫所内	266032	0532-85642906
山东畜牧兽医	自办发行	双月刊	18.00	山东省泰安市山东农业大学转	271018	0538-8242644
安徽畜牧兽医	自办发行	月刊	60.00	合肥市美菱大道 421 号	230001	0551-3636491
浙江畜牧兽医	自办发行	双月刊	24.00	杭州市凯旋路 268 号浙江大学动物科学学院转编辑部	310029	0571-86971701
福建畜牧兽医	34-81	双月刊	30.00	福建省福州市鼓屏路 153 号福建畜牧兽医编辑部	350003	0591-87856764
湖南畜牧兽医	42-276	双月刊	21.00	长沙市芙蓉区泉塘湖南省畜牧兽医研究所内	410131	0731-4615356 0758-2758902
南方饲料快讯	自办发行	半月刊	120.00	广东省肇庆前进北路 3 号翔盛花园五幢甲 101	526060	0758-2758903
江西畜牧兽医杂志	44-109	双月刊	21.00	江西省南昌市蛟桥省畜牧技术推广站内	330044	0791-3977707
中兽医学杂志	44-46	双月刊	24.00	江西省南昌市福州支路 2 号	330006	0791-6360234
贵州畜牧兽医	66-58	双月刊	30.00	贵州省贵阳市龙洞堡	550005	0851-5400593
云南畜牧兽医	自办发行	双月刊	30.00	昆明金殿云南省畜牧兽医科学研究所内	650224	0871-5017073
中兽医医药杂志	54-55	双月刊	36.00	甘肃省兰州市小西湖硷沟沿 335 号	730050	0931-2656034
中国草食动物 草业科学	54-57 54-51	双月刊 月刊	36.00 144.00	甘肃省兰州市小西湖硷沟沿 335 号 甘肃兰州市 61 号信箱	730050 730020	0931-2656124 0931-4865889
草原与草坪	54-13	双月刊	36.00	甘肃省兰州市安宁区甘肃农业大学	730070	0931-7631885
中国兽医科技	54-33	月刊	72.00	甘肃省兰州市盐场堡徐家坪 1 号	730046	0931-8342195
甘肃畜牧兽医	54-49	双月刊	15.00	甘肃省平凉市崆峒东路 143 号	744000	0933-8635625
青海畜牧兽医杂志	56-10	双月刊	24.00	青海省畜牧兽医科学院	810003	0971-5318387
新兽医	80-245	月刊	78.00	北京朝阳团结湖北三条甲 8 号农村养殖技术编辑杂志社	100026	010-85960115
中国动物保健	82-991	月刊	72.00	北京中关村南大街 8 号中国兽医药品监察所院内	100081	010-62112201
今日养猪业	80-261	双月刊	30.00	北京海淀板井北京市农林科学院信息所	100089	010-51503820
山西畜牧兽医	自办发行	双月刊	21.00	太原市迎泽大街 312 号	030001	0351-4080460
中国兽医学报	12-105	月刊	60.00	吉林省长春市西安大路 5333 号	130062	0431-7836531
广西畜牧兽医	48-107	双月刊	18.00	广西南宁市秀灵路 75 号广西大学东校园	530005	0771-3235650
海南畜牧兽医				海南省海口市龙昆南路 11 号金桃园公寓 702 室	570206	0898-65332821
肉品卫生	14-241	月刊	120.00	哈尔滨市香坊区红旗大街 259 号 4 楼 4-6 号	150001	
西藏畜牧兽医				拉萨市北郊夺底路 72 号	850003	
中国畜产与食品				江苏南京农业大学 179 信箱	210095	