

内蒙古白绒山羊 LDH-A 基因 cDNA 的克隆与特性分析

王志钢, 其布日, 包婵婵, 旭日干

(内蒙古大学生命科学学院/哺乳动物生殖生物学与生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021)

摘要: 【目的】克隆内蒙古白绒山羊乳酸脱氢酶 A (LDH-A) 基因并分析其基本表达模式。【方法】采用 RT-PCR 和 3' RACE 技术克隆基因, 将得到的基因 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列进行生物信息学分析。利用 RT-PCR 方法进行组织表达检测。【结果】获得了内蒙古白绒山羊 LDH-A 基因全长 cDNA 序列。该基因 cDNA 全长 1 649 bp, 包含一个 996 bp 的 ORF 和 642 bp 的 3' UTR。SMART 分析表明 ORF 编码的蛋白质具有 Ldh_1_N domain 和 Ldh_1_C domain, Psite 分析表明有 L-乳酸脱氢酶活性位点, PSORT 程序分析将其定位于细胞质中。LDH-A 基因在脾、肾、睾丸和肌肉组织中均有表达。【结论】内蒙古白绒山羊 LDH-A 基因编码的蛋白具有典型的乳酸脱氢酶结构, cDNA 核苷酸序列与牛的 LDH-A 基因 (NM_174099.2) 具有较高的同源性。在脾、肾、睾丸和肌肉组织中均有表达。

关键词: 内蒙古白绒山羊; LDH-A; 基因克隆; 表达模式分析

Cloning and Characterization Analysis of LDH-A Gene cDNA in Inner Mongolia Cashmere Goat

WANG Zhi-gang, Cheberi, BAO Chan-chan, Shorgen

(College of Life Science/Inner Mongolia University, The Key Laboratory of Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Huhhot 010021)

Abstract: 【Objective】The full length of LDH-A gene cDNA in Inner Mongolia Cashmere Goat was cloned and expression pattern analyzed. 【Method】RT-PCR and 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) methods were used to clone the gene. The nucleotide sequence was analyzed by BLAST and ORF Finder while the amino acid sequences was analyzed by SMART and Psite on line. Tissue expressions were analyzed by RT-PCR. 【Result】The full length of LDH-A gene cDNA in Inner Mongolia Cashmere Goat was cloned for the first time. The LDH-A gene was 1 649 bp in length, including an ORF of 996 bp and a 3'-UTR of 642 bp. SMART analysis suggested that the ORF encoding protein contained a Ldh_1_N and a Ldh_1_C domain. Psite analysis showed that there was lactate dehydrogenase active site in the protein, which localized in cytoplasm according to PSORT program analysis. LDH-A gene was expressed in the tissues of spleen, kidney, testicle and muscle. 【Conclusion】The LDH-A protein was encoded by LDH-A gene had typical structure of lactate dehydrogenase in Inner Mongolia Cashmere Goat. The goat LDH-A gene sequence shared high identity with bovine LDH-A gene (NM_174099.2) and was expressed in the tissues of spleen, kidney, testicle and muscle.

Key words: Inner mongolia cashmere goat; LDH-A; Gene cloning; Expression pattern analysis

0 引言

【研究意义】乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH; EC1.1.1.27) 是动物体内参与糖代谢的重要酶类, 利用 NADH 为辅酶催化丙酮酸还原生成乳酸, 在肌肉无氧代谢中发挥关键作用。对 LDH 同工酶基因

的研究不仅可以区别物种间的遗传差别和进化特征, 而且可为动物个体发育过程中基因表达和调控研究提供良好的模式。【前人研究进展】动物中的 LDH 有 3 个编码基因, 分别为 A、B 和 C, 对应的蛋白亚基为 A (M)、B (H) 和 C。LDH 以四聚体寡聚酶的形式发挥作用, 有 6 种同工酶, 分别为 LDH1 (B4)、LDH2

收稿日期: 2007-04-03; 接受日期: 2007-11-20

基金项目: 国家“863”计划 (2002AA242061)

作者简介: 王志钢 (1962-), 男, 蒙古族, 内蒙古赤峰人, 博士研究生, 研究方向为哺乳动物生殖生物学与生物技术。Tel: 0471-4995867-8008; E-mail: lswzg@imu.edu.cn。通讯作者旭日干 (1940-), 男, 蒙古族, 内蒙古兴安盟人, 中国工程院院士, 教授, 研究方向为哺乳动物生殖生物学与生物技术。E-mail: xrg@xzwlxz.imu.edu.cn

(AB3)、LDH3 (A2B2)、LDH4 (A3B)、LDH5 (A4) 和 LDH-C4, 其中 LDH-C4 仅在成熟动物的睾丸和精子中表达^[1-3], 而由 A、B 两个亚基组成的同功酶则具有明显的种属特异性和组织特异性并与其生化表现型和生理功能相适应^[4-7]。近年的研究表明 LDH 的表达还可能与微重力改变、牙齿发育和细胞周期有关^[8-10], 可能参与了 K_{ATP} 通道蛋白的组成^[11]。这些新的发现表明 LDH 基因在动物种属特异性的形成和个体发育中发挥重要作用。【本研究切入点】内蒙古白绒山羊 (Inner Mongolia Cashmere Goat) 是经过长期的自然选择和人工选育而形成的优良的产绒品种, 但在种质资源鉴定方面尚缺少有效的方法, 研究其 LDH 基因的核苷酸组成和特性, 将对优良绒山羊品系的保存和遗传育种具有重要意义。【拟解决的关键问题】建立有效的 RT-PCR 体系和 3'RACE 体系, 获得内蒙古白绒山羊 LDH-A 基因全长 cDNA 序列及该基因的基本表达模式特性。

1 材料与方法

1.1 材料

肌肉、脾、肾和睾丸组织样本取自内蒙古鄂尔多斯恩格贝内蒙古白绒山羊养殖基地, 取现场宰杀的组织块, 迅速放入液氮中冷冻, 带回实验室置-80℃冰箱中保存备用。总 RNA 抽提试剂盒 (RNAiso Reagent)、克隆载体 pMD19-T、反转录酶 AMV、3'RACE 试剂盒、LA TaqDNA 聚合酶、dNTP、Oligo d (T)₁₈Primers、内切酶、DNAMarker 购自 TaKaRa 公司, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、普通质粒小提试剂盒、IPTG、X-gal 购自 TIANGEN 公司, 其它试剂均为国产分析纯。大肠杆菌 DH5 α 由本室保存。

1.2 总 RNA 的提取及反转录

按总 RNA 提取试剂盒 (RNAiso Reagent) 说明书的操作方法提取总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 的完整性, 经紫外测定定量后, 用 Oligo d (T)₁₈Primers 按照反转录酶 AMV 说明书的方法反转录合成第一链 cDNA (cDNA1), 作为 PCR 扩增编码区片段的模板; 用 3'RACE 试剂盒自带的 Oligo dT-3sites Adaptor Primer 反转录合成用于 3'RACE 的 cDNA 第一链 (cDNA2), 作为 PCR 扩增 3'非翻译区片段的模板。基因克隆使用肌肉组织 cDNA 为模板。

1.3 PCR 引物设计、扩增、产物克隆及测序

根据 GenBank 上公布的牛 LDH-A 基因 cDNA 序列 (NM_174099.2), 经 Primer 5 软件分析设计了 1

对引物 P1、P2 用于扩增 LDH-A 的编码区片段。上游引物 P1: 5' AGTCCAAGATGGCAACTCTCAAG 3' 23mer, 下游引物 P2: 5' TGTAGCCTAGACAGTGAA GTGACAC 3' 25mer。编码区片段测序结果出来后再根据已知序列和 3'RACE 试剂盒中带的 3 sites Adaptor Primer (P4) 设计 P3, P3、P4 用于 3'非翻译区的扩增。3' RACE 上游引物 P3: 5' ACAGAATGGAATCTCAG ACGTTG 3' 23 mer, 3' RACE 下游引物 P4: 5' CTGAT CTAGAGGTACCGGATCC 3' 22mer。

用于扩增编码区片段的 PCR 体系 10 μ l: 肌肉 cDNA (cDNA1) 1 μ l, 2 \times GC buffer II (5 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺) 5 μ l, dNTP (各 2.5 mmol \cdot L⁻¹) 1.6 μ l, P1 (10 pmol \cdot μ l⁻¹) 0.5 μ l, P2 (10 pmol \cdot μ l⁻¹) 0.5 μ l, LA Taq (5 U \cdot μ l⁻¹) 0.2 μ l, ddH₂O 1.2 μ l。PCR 循环: 94℃ 4 min; (94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min) \times 35 cycles; 72℃ 10 min。

用于扩增 3'非翻译区片段 PCR 体系 10 μ l: 肌肉 cDNA (cDNA2) 1 μ l, 2 \times GC buffer II (5 mmol \cdot L⁻¹ Mg²⁺) 5 μ l, dNTP (各 2.5 mmol \cdot L⁻¹) 1.6 μ l, P3 (10 pmol \cdot μ l⁻¹) 0.5 μ l, P4 (10 pmol \cdot μ l) 0.5 μ l, LA Taq (5 U \cdot μ l⁻¹) 0.2 μ l, ddH₂O 1.2 μ l。PCR 循环: 94℃ 4 min; (94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 30 s) \times 35 cycles; 72℃ 10 min。

上述两个片段扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 分别回收特异性条带, 将其克隆到 pMD19-T 载体, 转化 *E.coli* DH5 α 。蓝、白菌落筛选阳性克隆, 重组质粒经酶切鉴定正确后测序。

1.4 LDH-A 基因 cDNA 序列测定

将分别含有 pMD19-LDHA 编码区片段和 3'非翻译区片段重组质粒的 *E.coli* DH5 α 送上海生工生物工程技术有限公司测序, 得到结果进行序列分析。

1.5 生物信息学方法

LDH-A 基因 cDNA 序列用 NCBI 上的 BLAST 进行序列比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), 开放阅读框 (ORF) 预测采用 Finder 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 蛋白质结构域分析采用 SMART 程序 (<http://smart.embl.de/>), 蛋白质功能位点分析采用 Psite 程序 (<http://www.softberry.com>), 蛋白质亚细胞定位采用 PSORT 程序 (<http://psort.nibb.ac.jp>)。

1.6 组织表达 RT-PCR 检测

收集内蒙古白绒山羊不同组织 (脾、肾、睾丸和肌肉) 材料, 提取总 RNA, 以反转录得到的 cDNA 第

一链为模板,以山羊 β -actin 编码 cDNA 为内源对照(引物 AP-1: 5' TGGCACCACACCTTCTACAACGAGC 3'; AP-2: 5' CGTCCCCAG AGTCCATGACAATG 3')进行 RT-PCR 分析。

2 结果与分析

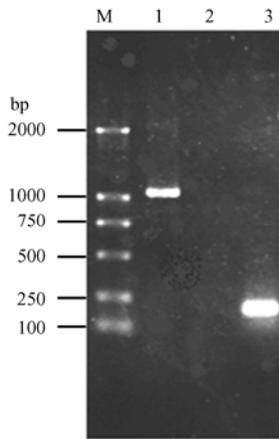
2.1 编码区片段的克隆与序列测定

用引物 P1、P2 以 cDNA1 为模板扩增得到与预期片段大小相符的特异性片段(图 1)。回收的 PCR 产物与 pMD-19T 连接成的重组质粒 pMD-LDHA1 经酶切鉴定正确(图 2)。序列测定结果表明,扩增出的

cDNA 片段(LDHA1)长 1 032 bp, 包含了全部的 CDS。

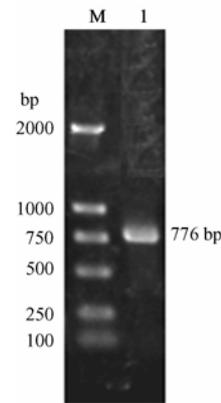
2.2 3'非翻译区片段克隆与序列测定

用引物 P3、P4 以 cDNA2 为模板扩增得到了特异性片段,琼脂糖电泳显示只有 1 条扩增条带(图 3)。回收的 PCR 产物与 pMD-19T 连接成的重组质粒 pMD-LDHA2 经酶切鉴定正确(图 4)。序列测定结果表明,扩增出的 cDNA 片段(LDHA2)长 776 bp, 去掉 PolyA 后的引物序列还有 754 bp。其中 TAA 前(含 TAA) 112 bp, 与前段编码区片段的相应部分序列完全吻合, TAA 至 PolyA 结束长 642 bp。



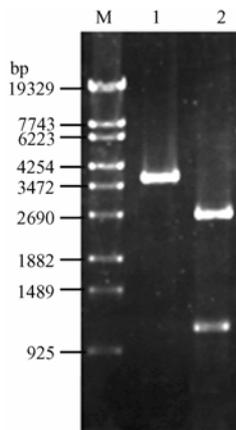
M: DL2000 marker; 1: PCR 产物; 2: 阴性对照; 3: 阳性对照 β -actin
M: DL2000 marker; 1: PCR products of LDHA1; 2: Negative control; 3: Positive control β -actin

图 1 LDHA1 PCR 产物电泳检测
Fig. 1 The PCR products of LDHA1 cDNA



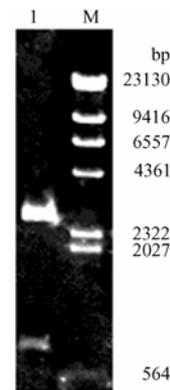
M: DL2000 marker; 1: PCR 产物
M: DL2000 marker; 1: PCR products of LDHA2

图 3 LDHA2 3' RACE 产物电泳检测
Fig. 3 Products of 3'RACE



M: λ -EcoT14 I digest; 1: pMD-LDHA1 EcoR I 单酶切; 2: pMD-LDHA1 EcoR I /HindIII 双酶切
M: λ -EcoT14 I digest; 1: pMD-LDHA1/EcoR I digest; 2: pMD-LDHA1/EcoR I +HindIII digest

图 2 pMD-LDHA1 酶切鉴定电泳检测
Fig. 2 Restriction analysis of recombinant vector pMD-LDHA1



M: λ -Hind III marker; 1: pMD-LDHA2EcoR I /Hind III 双酶切
M: λ -HindIII marker; 1: pMD-LDHA2/EcoR I +HindIII

图 4 pMD-LDHA2 酶切鉴定电泳检测
Fig. 4 Restriction analysis of recombinant vector pMD-LDHA2

2.3 基因序列分析

将分别测序的 LDHA1 和 LDHA2 两个片段经过序列比对、分析和拼接,克隆到的内蒙古白绒山羊 LDH-A 基因 cDNA 总长 1 649 bp, GC 含量为 40.9%。

最大的开放阅读框(ORF)为 996 bp, 位于 9~1 004 bp, 编码 332 个氨基酸残基。在 1 636 bp 处有一加尾信号 AATAAA (图 5)。可以认为克隆到了内蒙古白绒山羊 LDH-A 基因的全长 cDNA。

```

1   AGTCCAAG ATG GCA ACT CTC AAG AAT CAA CTG ATT CAG  AAT CTT CTT AAG GAA GAA CAT      59
      M A T L K N Q L I Q N L L K E E H
60  GTC CCC CAG AAT AAG ATT ACA GTT GTT GGG GTT  GGT GCT GTT GGC ATG GCC TGT GCC ATC      119
      V P Q X K I T V V G V G A V G M A C A I
120 AGT ATC TTA ATG AAG GAC TTG GCA GAT GAA ATT  GCT CTT GTT GAT GTC ATG GAA GAT AAA      179
      S I L M K D L A D E I A L V D V M E D K
180 CTG AAA GGA GAG ATG ATG GAT CTC CAA CAT GGC  AGC CTT TTC CTT AGA ACA CCA AAA ATT      239
      L K G E M M D L Q H G S L F L R T P K I
240 GTC TCT GGC AAA GAC TAT AAT GTA ACA GCA AAC  TCC AGG CTG GTT ATT ATC ACA GCT GGG      299
      V S G K D Y N V T A N S R L V I I T A G
300 GCA CGT CAG CAA GAG GGA GAG AGT CGT CTG AAT  TTG GTC CAG CGT AAC GTG AAC ATC TTT      359
      A R Q Q E G E S R L N L V Q R N V N I F
360 AAA TTC ATC ATT CCT AAT ATT GTA AAA TAC AGC  CCA AAT TGC AAG TTG CTT GTT GTT TCC      419
      K F I I P N I V K Y S P N C K L L V V S
420 AAT CCA GTC GAT ATT TTG ACC TAT GTG  GCT TGG AAG ATA AGC GGC TTT CCC AAA AAC CGT      479
      N P V D I L T Y V A W K I S G F P K N R
480 GTT ATT GGA AGT GGT TGC AAT CTG GAT  TCA GCT CGG TTC CGT TAT CTC ATG GGG GAG AGG      539
      V I G S G C N L D S A R F R Y L M G E R
540 CTG GGA GTT CAC CCA TTA AGC TGC CAT GGG TGG  ATC CTT GGA GAG CAT GGT GAC TCT AGT      599
      L G V H P L S C H G W I L G E H G D S S
600 GTC CCT GTA TGG GGT GCA GTG AAT GTT GCT GGT  GTC TCC CTG AAG AAT TTA CAC CCT GAA      659
      V P V W G G V N V A G V S L K N L H P E
660 TTA GGC ACT GAT GCA GAT AAG GAA CAG TGG AAA  GCA GTT CAC AAA CAA GTG GTT GAC AGT      719
      L G T D A D K E Q W K A V H K Q V V D S
720 GCT TAT GAG GTG ATC AAA CTG AAA GGC TAC ACA  TCC TGG GCC ATT GGA CTG TCA GTG GCC      779
      A Y E V I K L K G Y T S W A I G L S V A
780 GAT TTG GCA GAA AGT ATA ATG AAG AAT CTT AGG  CGG GTG CAT CCG ATT TCC ACC ATG ATT      839
      D L A E S I M K N L R R V H P I S T M I
840 AAG GGT CTC TAT GGA ATA AAA GAG GAT GTC TTC  CTT AGT GTT CCT TGC ATC TTG GGA CAG      899
      K G L Y G I K E D V F L S V P C I L G Q
900 AAT GGA ATC TCA GAC GTT GTG AAA GTG ACT CTG  ACT CAT GAG GAA GAG GCC TGT TTG AAG      959
      N G I S D V V K V T L T H E E E A C L K
960 AAG AGT GCA GAT ACA CTT TGG GGG ATC CAG AAA  GAA CTG CAG TTT TAA  AGTCTCTAATGT      1020
      K S A D T L W G I Q K E L Q F *
1021 TGT GTC ACT TCA CTG TCT AGG CTA CAC AGG ATT  TTA GTT GGA GGT TGT AAC TCA TAT TGT      1080
1081 CCT TTA TAT CTG ATC TGT GAT TAA AAC AGT AAT  GTT AAG ACA GCC TAG GAA AAA ATC AAT      1140
1141 TTC CTA ATG TTA GAA ATA GGA ATG GTT CAT AAA  ACC CTG CTG GAT GGC AAG GAA TGC TTC      1200
1201 ATG AAA CCT TGC AGC TGT ATC CTG ATG CTG CAT  GGC ACT TAC CTT GTG TGG TCC TAA ATT      1260
1261 GAT TTG TCA AAT AAT TCA ACT TCC TCA AGA GGT  TCC ACT GCC CAT GTT GCA GAT GCT GCA      1320
1321 GTT GCC CTT CAA ACC AGA TGT GTG TTT ACT GTG  TAA CAT AAC CTT TGG TTC CTT TAG CCA      1380
1381 AGG TGC CTA GTC CAA C-TT TTT CCC TCC AGT TGA  TCA CAT CCT GGG ATC CAA TGT ACA AA      1439
1440 TCC AGT ATT GCA TGC CAT GTG CAT AAC TGT TTT  AAA GAA TYT TAC GTA CTG TAT GTA TCA      1499
1500 GAA TAG TGT ACA TTG CCT TGT AAT GTA AAA AGG  AAA AAT TAC ATA AAT AAG GCA GCC AAC      1559
1560 TAA GTT AAC ACC AAC TAA AAC AAT AAA TAA AGC  TTG AAC AGT  GAAAAAAAAAAAAAAAAA      1619
1620 AAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAA

```

图 5 内蒙古白绒山羊 LDH-A 基因 cDNA 核苷酸序列

Fig. 5 The sequence of LDH-A cDNA in Inner Mongolia Cashmere Goat

2.4 编码蛋白分析

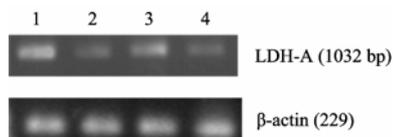
LDH-A 基因最大 ORF 编码一个由 332 个氨基酸残基组成的蛋白质, 该理论蛋白分子质量 36.6 kD, 等电点 (pI) 8.78, 氨基酸组成中 Leu 最高, 为 10.8%。SMART 分析表明在该蛋白质 21~161 氨基酸位形成 Rossmann 折叠, 是其 NAD 结合结构域 (Ldh_1_N domain), 在 163~329 氨基酸位是一个 α/β C 末端结构域 (Ldh_1_C domain)。Psite 分析表明在 84~87 氨基酸位有一个 N-糖基化位点, 32~258 氨基酸位有 4 个 N-豆蔻酰化位点, 35~296 氨基酸位有 3 个异戊二稀基结合位点, 21~170 氨基酸位有 6 个微体 C 端靶信号, 190~196 氨基酸位是其 L-乳酸脱氢酶活性位点, 3~212 氨基酸位有 5 个 PKC 磷酸化位点, 79~312 氨基酸位有 5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 232~239 氨基酸位有 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点。PSORT 程序将其定位于细胞质中。

2.5 同源性比较

BLAST 同源性检索显示 GenBank 中没有山羊 LDH-A 基因全长 cDNA 序列, 内蒙古白绒山羊 LDH-A 基因 cDNA 核苷酸序列与牛的 LDH-A 基因 (NM_174099.2) 有 97% (1566/1603) 的同源性, 与人的 LDH-A 基因 (AK223078.1) 有 91% (1015/1114) 的同源性, 而编码序列 (CDS) 同源性分别为 98% (986/999) 和 91% (916/999), 蛋白质氨基酸残基组成的同源性分别为 98% (328/332) 和 93% (310/332)。

2.6 组织表达特异性分析

组织材料 RT-PCR 分析表明, LDH-A 基因在脾、肾、睾丸和肌肉中都有表达 (图 6)。



1. 脾; 2. 肾; 3. 睾丸; 4. 肌肉
1. Spleen; 2. Kidney; 3. Testicle; 4. Muscle

图 6 内蒙古白绒山羊 LDH-A 基因组织表达特异性分析

Fig. 6 Expression tissue analysis of LDH-A in Inner Mongolia Cashmere Goat

3 讨论

LDH-A 属于 L-苹果酸脱氢酶 (L-malate dehydrogenase) 和 L-乳酸脱氢酶 (L-lactate

dehydrogenase) 超家族, 具有共同的 NAD 结合结构域 (Ldh_1_N domain) 和 α/β C 末端结构域 (Ldh_1_C domain) 两个特征性结构域^[12,13], 本试验克隆的内蒙古白绒山羊 LDH-A 基因 ORF 编码的蛋白质经 SMART 程序^[14]分析具有这两个结构域, 同时功能位点分析表明在 190~196 氨基酸位具有 L-乳酸脱氢酶活性位点, 进一步证明了绒山羊 LDH-A 结构与功能的一致性。

同工酶是动物物种间差别的一个自然性指标, 即使是同种动物在不同品种间同工酶的表达也有差别, 故往往被用于品种鉴定和进化分析的指标和基因表达调控的模式。Stock 等^[15]比较了不同类型的生物体 LDH 基因的氨基酸组成, 发现不同物种间 LDH-A 和 LDH-B 比较接近, 而 LDH-C 相差较远。Tsuji 等^[16]以氨基酸序列和其基因的 cDNA 核苷酸序列为指标分析了 32 个来自于哺乳动物、鸟类、鱼类、两栖类和细菌的 LDH 亚单位及其基因, 认为哺乳动物的 LDH-C 要比 LDH-A 和 LDH-B 分化较早, 这从进化的角度印证了哺乳动物 LDH-A 和 LDH-B 主要存在于体细胞, 而 LDH-C 只存在于成熟的睾丸和精子中。Ream 等^[17]分析了 51 种生存于不同温度环境的脊椎动物 LDH-A 基因的核苷酸组成, 发现 GC 含量与适应温度呈负相关, 由于基因核苷酸组成的遗传特性, 这种相关完全是出于系统发生的原故。

Ishiguro 等^[18]报告了牛 LDH-A 的基因结构和氨基酸组成 (NM_174099.2), 目前还没有山羊 LDH-A 基因序列的报道。序列分析表明内蒙古白绒山羊 LDH-A 基因的 ORF 与牛的大小一致, 编码蛋白的氨基酸序列与牛的同源性为 98%, 表明了 LDH-A 在进化上的保守性。

关于 LDH-A 基因的表达调控机制近年也有一些新的发现。启动子过度甲基化导致 LDH-A/B 基因表达沉默可能与某些肿瘤的形成有关^[19,20]。bFGF 和 TNF α 可以刺激 LDH-A 基因的表达并有剂量-时间效应^[21,22]。这预示着 LDH-A 基因的表达可能受到某些细胞信号转导通路的调节, 已经证明的调节因子包括了 C-myc 和 PKC^[23,24]。对于 LDH-A 基因表达调控分子机制的进一步揭示将有利于阐明其在进化、生理和个体发育中的作用。

内蒙古白绒山羊主要分布在内蒙古西部地区, 具有代谢旺盛、活动性强和对恶劣环境耐受力强的特点, 许玉德等^[25]报道了内蒙古白绒山羊在不同生理状态下 LDH 同工酶的表达特性, 结果显示雌性空怀期血

清 LDH 同工酶谱表现为 B 亚基占优势,但在妊娠期 B 亚基比例降低而 A 亚基的比例显著增加,这些结果一方面表明了 A 亚基在增强代谢补充能量方面的作用,另一方面说明了能量需求对 LDH-A 和 LDH-B 两个基因表达的调控作用。克隆到 LDH-A 基因和对基本表达模式的了解为进一步研究内蒙古白绒山羊特有的生理特性和生命活动特征的遗传本质创造了条件。

4 结 论

内蒙古白绒山羊 LDH-A 基因全长 cDNA 序列 1 649 bp。最大的开放阅读框 (ORF) 为 996 bp, 位于 9~1 004 bp, 编码 332 个氨基酸残基。在 1 636 bp 处有一加尾信号 AATAAA。核苷酸序列与牛的 LDH-A 基因 (NM_174099.2) 具有较高的同源性。编码的 LDH-A 蛋白具有典型的乳酸脱氢酶结构。在脾、肾、睾丸和肌肉组织中均有表达。

References

- [1] Jethanandani P, Goldberg E. *ldhc* Expression in non-germ cell nuclei is repressed by NF- κ B binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 35414-35421.
- [2] Olsson P G, Narisawa T H, Goldberg E, Millan J L. Abundance of repetitive sequence elements in the mouse testis-specific lactate dehydrogenase-C gene. *Journal of Andrology*, 2003, 24: 918-920.
- [3] Paik J, Vogel S Q L, Piantadosi R, Gottesman M, Lai K, Hamberger L, Vieira M M, Blaner W S. Vitamin A: Overlapping delivery pathways to tissues from the circulation. *The Journal of Nutrition*, 2004, 134: 276s-280s.
- [4] Alcazar O, Tiedge M, Lenzen S. Importance of lactate dehydrogenase for the regulation of glycolytic flux and insulin secretion in insulin-producing cells. *Biochemical Journal*, 2000, 352: 373-380.
- [5] Rheede T V, Amons R, Stewart N, Jong W W. Lactate dehydrogenase A as a highly abundant eye lens protein in platypus (*Ornithorhynchus anatinus*): Upsilon (t)-Crystallin. *Molecular Biology and Evolution*, 2003, 20: 994-998.
- [6] Imagawa T, Yamamoto E, Sawada M, Okamoto M, Uehara M. Expression of lactate dehydrogenase-A and -B messenger ribonucleic acids in chick glycogen body. *Poultry Science*, 2006, 85: 1232-1238.
- [7] Laughton J D, Bittar P, Charnay Y, Pellerin L, Kovari E, Magistretti P J, Bouras C. Metabolic compartmentalization in the human cortex and hippocampus: evidence for a cell- and region-specific localization of lactate dehydrogenase 5 and pyruvate dehydrogenase. *BMC Neuroscience*, 2007, 8: 35.
- [8] Moriya T, Kita K, Sugaya S, Wano C, Suzuki N. Enhanced expression of LDH-A gene after gravity-changing stress in human RSa cells. *Biological Sciences in Space*, 2002, 16(1): 12-17.
- [9] Losso E M, Nicolau J. Lactate dehydrogenase isoenzymes in dental pulp of rats according to stage of root. *Development Brazilian Dental Journal*, 2003, 14(1): 5-11.
- [10] Anouti F A, Tomavo S, Parmley S, Ananvoranich S. The expression of lactate dehydrogenase is important for the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 52300-52311.
- [11] Crawford R M, Budas G R, Jovanovic S, Ranki H J, Wilson T J, Davies A M, Jovanovic A. M-LDH serves as a sarcolemmal KATP channel subunit essential for cell protection against ischemia. *The EMBO Journal*, 2002, 21: 3936-3948.
- [12] Chapman A D M, Cortes A, Dafforn T R, Clarke A R, Brady R L. Structural basis of substrate specificity in malate dehydrogenases: crystal structure of a ternary complex of porcine cytoplasmic malate dehydrogenase, alpha-ketomalate and tetrahydroNAD. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 285: 703-712.
- [13] Madern D. Molecular evolution within the L-malate and L-lactate dehydrogenase super-family. *Journal of Molecular Evolution*, 2002, 54: 825-840.
- [14] Letunic I, Copley R R, Pils B, Pinkert S, Schultz J, Bork P. SMART 5: domains in the context of genomes and networks *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(Database issue): D257-260.
- [15] Stock D W, Whitt G S. Evolutionary implications of the cDNA sequence of the single lactate dehydrogenase of a lamprey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89: 1799-1803.
- [16] Tsuji S, Qureshi M A, Hou E W, Fitch W M, Li S S. Evolutionary relationships of lactate dehydrogenases (LDHs) from mammals, birds, an amphibian, fish, barley, and bacteria: LDH cDNA sequences from *Xenopus*, pig, and rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91: 9392-9396.
- [17] Ream R A, Johns G C, Somero G N. Base compositions of genes encoding α -actin and lactate dehydrogenase-A from differently adapted vertebrates show no temperature-adaptive variation in G + C content. *Molecular Biology and Evolution*, 2003, 20(1): 105-110.
- [18] Ishiguro N, Osame S, Kagiva R, Ichijo S, Shinagawa M. Primary structure of bovine lactate dehydrogenase-A isozyme and its synthesis in *Escherichia coli*. *Gene*, 1990, 91(2): 281-285.
- [19] Maekawa M, Taniguchi T, Ishikawa J, Sugimura H, Sugano K, Kanno T. Promoter Hypermethylation in Cancer Silences *LDHB*, Eliminating Lactate Dehydrogenase Isoenzymes 1-4. *Clinical Chemistry*, 2003,

- 49(9): 1518-1520.
- [20] Ishikawa J, Taniguchi T, Higashi H, Miura K, Suzuki K, Takeshita A, Maekawa M. High lactate dehydrogenase isoenzyme 1 in a patient with malignant germ cell tumor is attributable to aberrant methylation of the *LDHA* Gene. *Clinical Chemistry*, 2004, 50(10): 1826-1828.
- [21] Grataroli R, Boussouar F, Benahmed M. Role of sphingosine in the tumor necrosis factor a stimulatory effect on lactate dehydrogenase A expression and activity in porcine sertoli cells. *Biology of Reproduction*, 2000, 63: 1473-1481.
- [22] Riera M F, Meroni S B, Schteingart H F, Pellizzari E H, Cigorraga S B. Regulation of lactate production and glucose transport as well as of glucose transporter 1 and lactate dehydrogenase A mRNA levels by basic fibroblast growth factor in rat sertoli cells. *Journal of Endocrinology*, 2002, 173: 335-343.
- [23] Lewis B C, Prescott J E, Campbell S E, Shim H, Orłowski R Z, Dang C V. Tumor induction by the c-Myc target genes *rc1* and lactate dehydrogenase A. *Cancer Research*, 2000, 60: 6178-6183.
- [24] Short S, Tian D, Short M L, Jungmann R A. Structural determinants for post-transcriptional stabilization of lactate dehydrogenase A mRNA by the protein kinase C signal pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 12963-12969.
- [25] 许玉德, 陈晋安, 杨国珍, 高文厚. 不同生理状态下二狼山白绒山羊 LDH 同工酶的表达. 厦门大学学报(自然科学版), 1997, 36(1): 131-134.
- Xu Y D, Chen J A, Yang G Z, Gao W H. Expression of LDH isozyme of Erlangshan goats in different physiologic status. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 1997, 36(1): 131-134. (in Chinese)
- (责任编辑 高 雨, 林鉴非)

《核农学报》征订启事

《核农学报》(Journal of Nuclear Agricultural Sciences)于1987年由原子能农学会和中国农业科学院原子能利用研究所共同创办,是核技术和生物物理技术在农业和生物学应用研究领域唯一的学术期刊。主要刊登核技术(包括各种辐射源人工诱变遗传和育种技术、辐照加工技术和同位素示踪技术等)在农业科学中应用的学术论文、综述、专论、科技信息及知识介绍等。此外,还适当刊登其它相关技术,如农产品和食品贮藏加工、生态农业、农业生物技术、农业信息技术、节水农业、精品农业等方面的学术论文。本刊能充分、及时地报道近年来我国在该领域研究和应用的重要成果,为科研和教学提供了宝贵的参考资料,对农业生产和本学科的发展起了推动作用。

本刊一直在农业原子能应用领域保持着较高的声誉和知名度,属“中文核心期刊”、“中国科技论文统计源期刊”、“中国科学引文数据库统计期刊”,已进入万方网络版、中国期刊网、维普网络版、思博网等网络数据库。据《2007年中国期刊引证报告(核心版)》中,《核农学报》2006年的影响因子为0.832。

本刊的征稿细则及征订启事详见:<http://hnxb.chinajournal.net.cn/>

《核农学报》(ISSN 1000-8551, CN11-2265/S)为双月刊,每期定价20.00元,全年120.00元。国内为本刊编辑部自办发行,国外发行代号:BM449。

欢迎订阅,欢迎发布广告。

联系地址:北京5109信箱《核农学报》编辑部(邮编:100193)

电话/传真:010-62815961; E-mail: hnxb5109@263.net