

文章编号: 1007-2985(2009)05-0077-05

鲤 NADH 泛醌氧化还原酶亚基 3 基因的 克隆及低温适应相关性分析*

梁利群^{1,2}, 常玉梅², 邹庆薇³, 雷清泉¹

(1. 哈尔滨理工大学电气与电子工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150080; 2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 3. 南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要: 根据鲤低温下特异表达的基因(片段)序列设计引物, 采用 2 轮菌落 PCR 方法对鲤脑全长 cDNA 文库中的克隆进行筛选, 确定了基因序列 152 在文库中的位置, 经生物信息学比对分析确定其为 NADH 泛醌氧化还原酶亚基 3 基因. 这一基因在低温下的特异表达, 对于低温下鱼类机体的供能, 起着重要作用. 结果还表明, NADH 泛醌氧化还原酶亚基 3 基因在鲤氧化呼吸链电子传递系统中与低温适应性状在一定程度上存在相关性.

关键词: 鲤; NADH 泛醌氧化还原酶亚基 3 基因; 克隆; 低温适应

中图分类号: Q78

文献标识码: A

极端环境下的耐低温鱼类, 在几千万年的进化历程中获得了许多抵抗低温的生理适应机制. 揭示、发掘参与这些低温适应机制的特殊基因的功能, 并加以开发利用, 对培育耐低温的鱼类新品种具有重要意义. 目前已报道的鱼类低温适应机制的研究主要从细胞膜的流动性、酯类、一些同功酶的差异及神经调控、代谢^[1-12]等生理、生化和分子遗传角度进行, 但是对鱼类低温适应的遗传基础尚不明确. 笔者曾在构建广温性鱼类低温适应研究实验鱼体系的基础上, 利用抑制消减杂交技术构建了鲤脑组织低温差异表达 cDNA 文库^[13], 获得了 350 个在低温下特异表达或表达上调(增强)的基因(或片段). 其中部分基因或基因片段序列与冷诱导蛋白基因、跨膜蛋白、细胞色素氧化酶等存在较高的同源性. 这一结果证明鱼类对低温的适应性状是数量性状, 受多基因控制. 同时, 为了获得这些在低温下特异表达的基因全长序列, 笔者曾构建了鲤脑全长 cDNA 文库^[14]. 为后续克隆与低温适应相关的功能基因、进一步阐明广温性鱼类低温适应机制奠定了基础.

本实验在已开展工作的基础上, 根据所获得的鲤低温下特异表达的基因(片段)序列设计引物, 以鲤脑全长 cDNA 文库中的克隆作为模板进行菌落 PCR, 采用一种 PCR 方法分 2 轮筛选鲤脑 cDNA 文库, 确定了 NADH 泛醌氧化还原酶亚基 3 基因克隆在文库中的具体位置, 并对目的克隆进行了序列测定及生物信息学分析, 从分子遗传基础角度证明鲤氧化呼吸链电子传递系统中 NADH 泛醌氧化还原酶亚基 3 基因与低温适应性状在一定程度上存在相关性.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试剂 细菌培养所用相关试剂均购自 OXOID 公司; 琼脂糖购自 BIOWEST 公司; GOLDView 染料购自赛百盛公司; Taq DNA Polymerase 购自 MBI 公司; 质粒提取试剂盒购自 V-gene biotechnology limited 公司; DNA Maker DL2000 购自宝生物工程(大连)有限公司. 实验室常用试剂为国产分析纯.

1.1.2 生物软件和网站 BLAST(basic local alignment search tool), NCBI (National Center for Biotechnology

* 收稿日期: 2009-06-16

基金项目: 国家重大基础研究“973”资助项目(2004CB117404)

作者简介: 梁利群(1963-), 女, 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所研究员, 主要从事鱼类基因工程育种研究.

Information) 网站, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/; Primer Premier 3.0 引物设计软件, 引物设计网站 <http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>; 生物分析软件 DNAMAN, 网站 www.bio-soft.net.

1.2 实验方法

1.2.1 保存文库 LB 固体培养基的配制参考文献[15]. 培养基灭菌, 冷却至 60 °C 加氨苄青霉素(200 μL/100 mL), 在其凝固前加至 96 孔培养板中. 用无菌牙签挑取鲤脑 cDNA 文库中的单克隆, 分别划在含 LB 固体培养基的 96 孔培养板上. 将培养板编号, 倒置于恒温培养箱中 37 °C 培养 12 h, 用封口膜封好, 于 4 °C 冰箱保存.

1.2.2 设计引物 分析低温下特异表达的基因片段, 利用麻省理工大学引物设计网站 <http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-prime> 针对目的基因(片段)序列设计引物. 综合引物长度、 T_m 值、GC 百分含量、目的片段大小、引物自身性质等参数以及 Primer Premier 3.0 引物设计软件的设计结果, 选取较理想的引物送至大连宝生物公司进行引物合成.

1.2.3 筛选引物 以构建鲤脑 cDNA 文库的 2 管 cDNA 第 1 链作为模板, 根据其浓度不同, 分别稀释 20 倍、200 倍备用, 建立 PCR 反应体系进行引物筛选.

PCR 反应体系: 总体积 15 μL, 其中模板 1 μL, Primer 1 μL, Buffer 10.8 μL, Taq DNA polymerase 0.2 μL, dH₂O 2 μL. PCR 反应程序: 94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 56, 58, 60 °C 等 30 s 40 个循环, 72 °C 1 min, 72 °C 10 min, 4 °C ∞.

反应结束加溴酚蓝 3 μL, 旋涡振荡混匀后稍做离心, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, 在凝胶成像仪下观察记录电泳结果. 比对目的片段大小, 选出可以扩增出特异性条带的引物.

1.2.4 菌落 PCR 用无菌牙签分别挑取保存在 96 孔培养板上的克隆作为模板, 以筛选出的特异性引物进行菌落 PCR. 反应体系: 2 μL Primer, 36 μL Buffer, 0.5 μL Taq DNA, 11.5 μL dH₂O, 总体积 50 μL.

第 1 轮筛选: 取无菌 96 孔 PCR 板, 选择 1 对引物, 按以上体系配混合液. 加混合液, 用无菌牙签分别挑取保存在 96 孔培养板中 cDNA 文库克隆的 1 列(含 8 个克隆), 加入同一个孔中进行菌落 PCR(条件同上). 依此类推, 每个 96 孔 PCR 板可以筛选 8 板 cDNA 文库中的克隆. PCR 结束经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以此锁定含特异克隆所在的范围.

第 2 轮筛选: 以能够扩增出目的片段的 1 列所含的 8 个克隆分别作为模板, 进行第 2 次菌落 PCR 反应, 电泳检测, 最终确定目的克隆所在的位置.

1.2.5 菌种保存与序列测定 将含有目的克隆的菌板于 37 °C 培养 1 h. 分别配制 LB 固体培养基和液体培养基. 将固体培养基加入培养板, 液体培养基装入小锥形瓶. 用无菌牙签挑取包含目的基因的克隆, 在小锥形瓶的液体培养基中蘸一下, 37 °C, 220 r/min 振荡培养过夜. 次日取 50 μL 菌液加入 50 μL 甘油, 保存于 -80 °C 冰箱. 同时, 用无菌牙签挑取包含目的基因(片段)的克隆, 划在含 LB 固体培养基的 96 孔培养板上, 送至北京诺赛基因组研究中心有限公司进行正、反向全长序列测定.

1.2.6 质粒提取与 PCR 检测 质粒提取按照质粒提取试剂盒说明进行. PCR 引物和测序引物均根据文库质粒载体 pAP3neo 的 T₇ Promoter 和 T₃ Promoter 序列设计.

T₇ Promoter Primer: 5'-TAATA CGACTCACT ATAGGG-3'.

T₃ Promoter Primer: 5'-ATTAA CCCTCACTAAAGGGCG-3'.

PCR 反应体系: 总体积 25 μL, 其中模板质粒 1 μL, T₇ Promoter Primer 0.5 μL, T₃ Promoter Primer 0.5 μL, Buffer 18 μL, Taq DNA polymerase 0.2 μL, H₂O 4.8 μL. PCR 反应条件: 94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 55 °C 40 s 36 个循环, 72 °C 3 min, 4 °C ∞.

反应结束, 取 5 μL PCR 反应产物, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测.

2 结果

2.1 保存文库

将鲤脑 cDNA 的文库中的克隆保存在含 LB 固体培养基的 96 孔测培养板, 共计 444 板, 42 624 个克隆.

2.2 筛选引物

采用 2 个模板,用所有引物进行 PCR 反应. 延伸温度为 58 ℃时,引物 065 可以扩增出目的带,所以确定引物 065 的延伸温度为 58 ℃. 同理,共确定出 6 对可用引物,列于表 1.

表 1 鲤鱼耐低温性状相关基因引物

Table 1 Primer Pairs of Genes Associated with Cold Tolerance

引物编号	退火温度	引物序列 5' ~ 3'
065	58 ℃	F: aaacaactaccagggtggett R: gccacaaaagtaaggaaactc
104	54 ℃	F: t dtg ggcacagtgcggtaat R: ttt aacatcgcaactgat tc
128	54 ℃	F: acg egg gg gat at aag aga at R: ttt tttatcgagttgtcgg g
152	54 ℃	F: g accacg gag g aa g aaaa R: gcgttacag atagaaaactg ac
249	52 ℃	F: ttttttttgcctgttcaac R: tgtgttttccaat tgaacc
307	52 ℃	F: tttttttgccttg ceg ttcag cctta agatcttgggtt R: acaggttgaccaaccaaat

2.3 菌落 PCR

通过对文库中 42 624 个菌落的 PCR 筛选得到了 6 对引物(065, 104, 128, 152, 249, 307)在 cDNA 文库中相应的目的克隆. 位置分别为: 065, 48 板 10G; 104, 156 板 11B; 128, 108 板 8A, 8E; 152, 57 板 8E, 58 板 7D; 249, 337 板 6C; 307, 19 板 4E. 图 1 为 307 号基因在文库中的筛选示例. 图 1 中: M 为分子量标准. 第 1 轮筛选: 19 板的 12 列中第 4 列扩增出了目的条带,说明目的克隆在第 4 列中. 第 2 轮筛选: 19 板第 4 列的 8 个孔中第 5 孔扩增出了目的带,说明该克隆为目的克隆,所在位置为 19 板 4E.

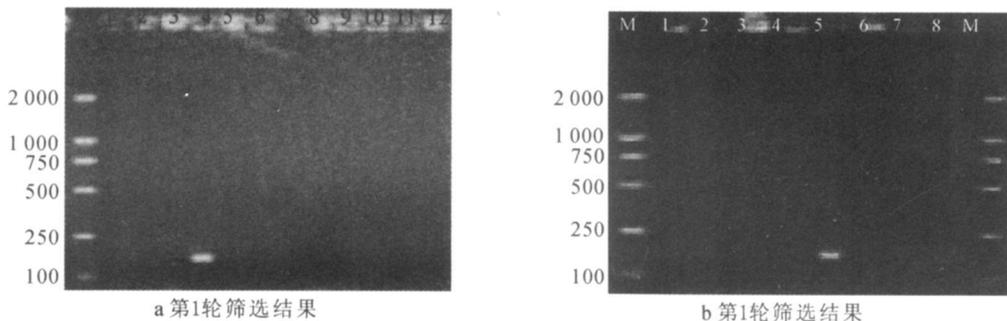


图 1 307 号目的基因的文库筛选结果

Fig. 1 Screening Results of Target Gene 307

2.4 质粒提取及 PCR 检测

目的克隆质粒 PCR 检测结果如图 2 所示. 图 2 中: M 为分子量标准; 1~ 5 分别为引物 065, 128, 152, 152, 307 扩增出的目的片段. 从图 2 可知: 引物 065 的目的克隆扩增出了 2 条带, 其中 1 条 1 500 bp 左右的带较亮, 另 1 条 700 bp 左右的带很弱. 推测该样品为双克隆, 需再次分离获得单克隆后进行测序. 引物 128 和 152 的目的片段大小都在 650~ 750 bp 左右. 引物 307 的目的片段较大, 在 1 700 bp 左右.

2.5 序列测定与比对分析

使用 T₇ Promoter Primer 和 T₃ Promoter Primer 作为测序引物, 将 5 个引物在鲤鱼脑 cDNA 文库中筛选出的目的克隆进行正反向全长测序. 使用 Blast 2 Sequences 比对正反向测序结果, 将 2 段序列进行整合, 去除载体序列. 其中引物 152 得到 834 bp 长的目的基因. 在 NCBI 上使用 Blastn 搜寻 GenBank 的非冗余核苷酸数据库(nr), 结果显示该序列与鲤鱼线粒体某基因序列有 99% 相似性, 期望值为 0.0. 该基因编码 NADH 泛醌氧化还原酶亚基 3(NADH ubiquinone oxidoreductase subunit 3). Blastx 比对发现所得序列与金鱼线粒体假定蛋白有 89% 相似性, 期望值为 6e- 32.

使用 ORF Finder 寻找该序列的 ORF, 显示该基因的完整开放读码框大小为 354 bp, 编码 118 个氨基

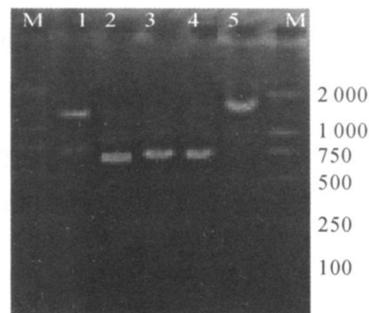


图 2 目的克隆质粒 PCR 检测结果

Fig. 2 PCR Results of Target Cloning Plasmid

酸,如图 3 所示.图 3 中:碱基序列在上,氨基酸序列在下;起始密码和终止密码用底纹和加粗标记;信号肽用表示□.经分析,该蛋白 pI 10.86,分子量 12.59 kD,前 14 个氨基酸编码信号肽.表明该蛋白为一分泌蛋白.疏水性分析(图 4)表明该蛋白含疏水部分和亲水部分,为跨膜蛋白.

```

ATGTTGCCTTACTTCTAGGCTGTACGGAAGTGTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCTGCAGGAGCTCGGACCGGCCCTTAGGA
M L P L L L G L Y G S V T S A L K A A A G A R T G P L G
CGCGTAATACGACTCACTATAGGGAATTCCTGGGGCTAAACGAGGGCTTAACTGTCTCCCTTTCAAGTCAGTGAAATGATC
R V I R L T I G N S R G L N E G L T V S P F K S V K L I
TACCCGTGCAGAAGCGGGTATAATACTACAAGACGAGAAGACCTTTGGAGCTTAAGGTACAAAACTCAACCACGTTAAGCAAC
Y P C R S G Y N T T R R E D P L E L K V Q N S T T L S N
TCAATAAAAAGCAAAAACCTTGTGGACCATGAGATTTTACCTTCGGTTGGGGCGACCACGAGGAAAAGAAAAGCCCTCCAGGTGG
S I K S K N L V D H E I L P S V G A T T E E R K A S R W
ACTGGGAAAACCTCCAAACCAAGAGAGACATCTCTAAGCCACAGAACATCTGACCAAATATGATCCGGCTAACACATAGCCG
T G K T S *
ATCAACGAACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCTCTCCAGAGTCCATATCGACGAGGGGTTTACGACCTCGATGT
TGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCGTTTGTTCACGATTAAGTCTTACGTGATCTGAGTTCAGAC
CGGAGCAATCCAGGTGAGTTTCTATCTGTAACGCTACTTTTCTAGTACGAAAGGATCGGAAAAGAGGGGCCATACTTAAAGC
ACGCCCCACCCCTAATTTATGAAAACAAATAAATAAATAAAGGGAGAGCCAAATCCAGCTGCCAAAATAAGGACATACTGGA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGCCGCCCTTTAGTGAGGGTTAATTTAAATCGTACGTCCGATTAATTAACCG

```

图 3 鲤鱼 NADH 泛醌氧化还原酶亚基 3 基因的 cDNA 序列及推测的氨基酸序列

Fig. 3 cDNA Sequence and Amino Acids of NADH-Quinone Oxidoreductase 3 Subunit Gene

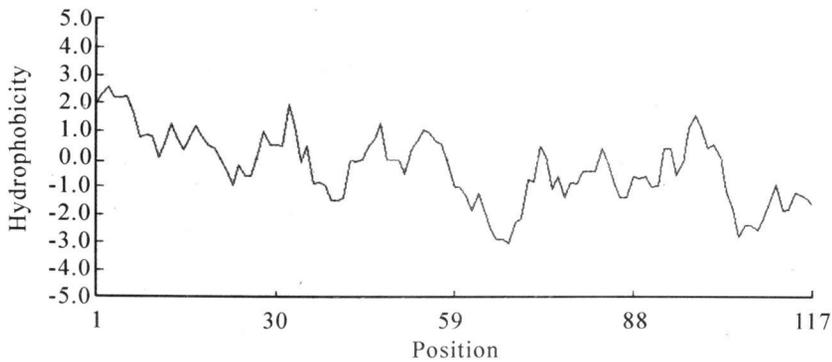


图 4 NADH 泛醌氧化还原酶亚基 3 疏水性分析

Fig. 4 Hydrophobicity Analysis of NADH-Quinone Oxidoreductase 3 Subunit Gene

3 讨论

生物体内各种复杂的化学反应需要大量的能量,这些能量主要依靠生物体对糖类、脂类等有机物的氧化作用——生物氧化.这种氧化反应是在酶催化下完成的,能量逐步释放^[16].线粒体内的生物氧化对机体能量供应十分重要,是细胞的“能量工厂”.它将营养物质氧化所释放的大部分自由能捕获,使 ADP 磷酸化生成 ATP.其余能量以热能形式释放,维持体温.而线粒体内主要的呼吸链有 2 条:NADH 氧化呼吸链和琥珀酸氧化呼吸链.泛醌是一种脂溶性醌类化合物,它有较长的多个异戊间二烯构成的侧链.因侧链的疏水作用,它能在线粒体内膜中迅速扩散.可以产生更多的能量,维持机体正常功能和体温.还可以刺激摄食,进一步提高抵御寒冷的能力.

本研究对鲤在低温条件下特异表达的基因中克隆,发现 NADH 泛醌氧化还原酶亚基 3 基因的存在.作为 NADH 氧化呼吸链电子传递系统的第 1 个酶——NADH 泛醌氧化还原酶,它在低温下的特异表达,对于低温时鱼类机体的供能起着重要作用.这与低温条件下鱼类机体代谢减慢,摄食不活泼,如果能量供应不足,就会产生冷休克甚至死亡的报道^[17]是相符的.NADH 泛醌氧化还原酶亚基 3 基因在低温下特异表达说明该基因与鱼类的低温适应性状在某种程度上可能存在一定相关性.这些结果拓展了我们在鱼类低温适应机理研究思路,后续的研究可通过对其进行定量分析和真核表达功能验证,进一步确定这一基因在鱼类低温适应过程中的作用.

作为最低等的脊椎动物鱼类, 由于其进化地位低等, 多数的遗传性状是数量性状, 是由多基因控制的, 与高等动物的多数性状是由 1 个或几个基因所控制不同. 已往鱼类低温适应性状的研究结果也说明鱼类对低温适应是一个复杂的过程, 它涉及生理、生化反应, 遗传、进化基础等多个学科. 这些结果说明控制这一性状的基因可能形成一个网络从诸多方向和不同侧面对低温产生应答, 使鱼体产生一系列的生理、生化反应. 因此, 在对其进行低温适应机理、耐低温育种研究过程中采取多学科交叉、综合分析的方法必将推进这一世界性难题的最终解决.

参考文献:

- [1] LYONS J M, GRANHAM D, RASION J K. Low Temperature Stress in Corp Plants: The Role of the Membrane [M]. New York: Academic Press, 1970: 33- 56.
- [2] 邓会山, 桂远明. 鱼血红细胞膜流动性的研究 [J]. 大连水产学院学报, 1993, 8(1): 9- 13.
- [3] BROWN W D. Glucose Metabolism in Carp [J]. Cellular Comp Physiol, 1960, 55: 81- 85.
- [4] 冯祖强, 王祖熊. 鲢鱼冷休克及其死亡的某些生化因素 [J]. 水生生物学集刊, 1984, 8(3): 290- 297.
- [5] 桂远明. 几种养殖鱼类越冬生理生化指标的变化II ——脑 AchE、LDH 同工酶、EST 同工酶 [J]. 北方越冬鱼类死亡原因及提高成活率的研究, 1995, 83- 92.
- [6] 李 勇, 丁雷, 李 言, 等. 低温对鲤鱼的几个基因在不同组织中表达量的影响 [J]. 动物学报.
- [7] 梁利群, 孙效文, 沈俊宝, 等. 鲤鱼抗寒性状的 RAPD 分析 [J]. 中国水产科学, 1997, 4(3): 89- 91.
- [8] 梁利群, 孙孝文, 沈俊宝, 等. 鲤鱼抗寒性状的 RAPD 分析 [J]. 中国水产科学, 1997, 4(3): 89- 91.
- [9] 潘 贤, 梁利群, 雷清泉. 筛选与鲤鱼抗寒性状相关的微卫星标记 [J]. 哈尔滨工业大学学报. 2008, 40(6): 915- 918.
- [10] 冯祖强, 王祖熊. 鱼类对环境温度适应问题 [J]. 水产学报, 1984, 8(1): 79- 83.
- [11] BROWN W D. Glucose Metabolism in Carp [J]. J. Cellular Comp. Physiol, 1960, 55: 81- 85.
- [12] PETER A, FIELDS, GEORGE N, et al. Hot Spots in Cold Adaptation: Localized Increases in Conformational Flexibility in Lactate Dehydrogenase A4 Orthologs of Antarctic Notothenioid Fishes [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1998, 95(19): 11 476- 11 481.
- [13] 李 言, 何 薇, 丁雷, 等. 鲤脑组织 cDNA 文库的构建及脑室管膜素基因鉴定 [J]. 中国水产科学, 2009, 16(2): 147- 155.
- [14] 梁利群, 李绍戎, 常玉梅, 等. 抑制消减杂交技术在鲤鱼抗寒研究中的应用 [J]. 中国水产科学, 2006, 13(2): 193- 199.
- [15] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1995: 908.
- [16] 黄熙泰, 于自然, 李翠凤. 现代生物化学 [M]. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2008: 259.
- [17] 祖岫杰, 刘艳辉. 从能量角度谈鲤鱼越冬 [J]. 内陆水产, 1993(10): 12- 13.

Cloning and Correlation Analysis of Cold Adaptation of NADH-Quinone Oxidoreductase 3 Subunit Gene from Common Carp (*Cyprinus Carpio*)

LIANG Li-qun^{1,2}, CHANG Yu-mei², ZOU Qing-wei³, LEI Qing-quan¹

(1. College of Electrical & Electronic Engineering, Harbin University of Science and Technology, Harbin 150080, China;
2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070,
China; 3. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Genes expressed specifically at low temperature were used to design primers and to screen brain full-length cDNA library of common carp (*Cyprinus carpio*) through two rounds of clonal PCR method. After that, gene 152 was discovered and sequenced, and determined finally as NADH-quinone oxidoreductase 3 subunit gene using homologous searches. This gene was confirmed to play an important role as the force generators for fish in a low water environment. In addition, NADH-quinone oxidoreductase 3 subunit gene was associated with cold adaptation of common carp to some extent in oxidation of respiratory chain electron transport system.

Key words: common carp (*Cyprinus carpio*); NADH-quinone oxidoreductase 3 subunit gene; cloning; cold adaptation

(责任编辑 易必武)