

斜带石斑 β 珠蛋白 cDNA 的克隆和序列分析^{*}

殷志新, 何建国

(中山大学生命科学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 从斜带石斑 *Epinephelus coioides* 白细胞 cDNA 文库随机挑取噬菌斑, 做为模板, 用 λ TriplEx 5'3' 长距离插入子筛选引物, 进行插入片断的 PCR 扩增, 并进行表达序列探针 (ESTs) 测定。从中克隆到了血红蛋白 β 亚基 cDNA。cDNA 包含长达 444 bp 的开放阅读框, 编码 147 个氨基酸的多肽。用 www.expasy.ch 网站的 compute pI/MW 程序计算其可能的相对分子质量为 16 544, 等电点为 6.95。其氨基酸序列与草鱼 β -珠蛋白 III 的同源性最高, 为 73.0%。在远端和近端的与血红素结合的组氨酸都是保守的。另外, 与其它鱼类及蛙、鸡和人的 β -珠蛋白比较, 在血红素结合区及亚基结合区的氨基酸残基均是高度保守的。

关键词: 斜带石斑 *Epinephelus coioides*; 血红蛋白 β 亚基; 表达序列探针 (ESTs); cDNA 文库

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 01-0058-04

石斑鱼是驰名世界的名贵海产鱼类之一, 其肉质鲜美, 营养丰富, 为餐桌上的上等佳肴, 深受各地消费者的喜爱。由于石斑鱼生长快, 市场价格高而稳定, 因而深受养殖者的欢迎, 是我国南方传统海水养殖名贵鱼类, 有着巨大的开发潜力, 具有显著的社会经济效益。然而, 在石斑鱼的育苗和养成过程中, 受到各种病害的袭击^[1], 成为制约石斑鱼养殖业发展的主要因素。因此有必要对石斑鱼进行深入的免疫学和分子生物学的研究, 以揭示其发病机理, 为疾病的控制打下基础。在构建了斜带石斑白细胞的 cDNA 文库的基础上^[2], 本文在进行随机测定表达序列探针 (ESTs) 过程中, 克隆了血红蛋白 β 亚基 cDNA。

1 材料和方法

1.1 PCR 扩增插入子

从斜带石斑 *Epinephelus coioides* 白细胞 cDNA 文库随机挑取噬菌斑, 做为模板, 用 5' 和 3' λ TriplEx 长距离插入子筛选引物 (AP1 和 AP2) 扩增插入子, 按文献 [2] 进行。

1.2 PCR 产物回收纯化

用上海生工生物工程公司的 PCR 产物胶回收试剂盒, 按说明书进行。

1.3 PCR 产物序列测定

取 5~20 ng PCR 产物为模板, 组成 20 μ L 循环

反应体系: PCR 产物 5~20 ng, ABI PRISM Big Dye-Terminator Mix 2 μ L, 5 $\times$ 工作缓冲液 4 μ L, 引物 AP1 (1.6 mmol/L) 1 μ L, 加水至 20 μ L。

按 ABI PRISM Big Dye Terminator Mix 说明书进行循环反应, 异丙醇纯化和序列测定。

1.4 测序结果的分析

用美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 的 BLAST N 和 BLAST X 工具, 与 GenBank 的数据库进行同源性比较, 了解测得的 ESTs 与已知基因或已知 ESTs 的相似性。

1.5 β 珠蛋白相对分子质量及等电点的计算

使用 www.expasy.ch 网站的 Compute pI/MW 程序进行。

1.6 β 珠蛋白与其它物种序列的比较

用 DNASTAR 公司的 MegAlign 4.01 版进行, 用 Jotun Hein 方式进行比较。

2 结果与讨论

2.1 斜带石斑 β 珠蛋白 cDNA 的序列

随机挑取噬菌体克隆进行扩增插入片断测序, 其中 B69 号噬菌体的插入片断的序列经 BLAST 分析, 与其它物种的 β 珠蛋白 cDNA 序列相似。该 cDNA 全长 599 bp, 含最长的 444 bp 的一个开放阅读框, 编码 147 个氨基酸的蛋白质序列。经计算其可能的相对分子质量为 16 544, 等电点为 6.95。开

* 收稿日期: 2002-04-19

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2001AA621010); 国家自然科学基金资助项目 (30271030); 广东省自然科学基金团队研究资助项目 (20023002)

作者简介: 殷志新 (1970 年生), 男, 讲师, 现工作单位为第一军医大学分校; 通讯联系人: 何建国;

E-mail: lshrc05@zsu.edu.cn

放阅读框从第一个起始密码子 ATG 开始, 延伸到终止密码子 TAG 结束。在 ATG 上游有 33 个非编码碱基, 在终止密码子下游有 94 个非编码碱基。序列包含 poly A 尾巴, 并在其上游 12 个碱基处有 poly A 信号 AATAAA。β 珠蛋白远端和近端的组氨

酸残基是血红素结合区, 其在多个物种都是保守的, 它们对血红蛋白完成载氧功能十分重要。在斜带石斑, 这 2 个组氨酸在预测的位置。同时 C 末端的 147 位也是组氨酸, 是形成 Bohr 效应的重要因素^[3]。

```
1  GAG GAC TAG TTG AAC AAC CCT AAA GCC GGC AAA ATG GTC GAA TGG ACA GAC AAA GAG CGT 60
1                                     M   V   E   W   T   D   K   E   R   9
61  ACC ACC ATC CAAGAC CTC TTC AGT AAG ATT GAC TAT GAT GCC GTC GGC CAA GCA ACT CTT 120
10  T   T   I   Q   D   L   F   S   K   I   D   Y   D   A   V   G   Q   A   T   L   29
121 TGC AGG TGT CTG ATC GTC TAC CCC TGG ACT CAG AGG TAT TTC GCC AAG TTT GGA AAC CTC 180
30  C   R   C   L   I   V   Y   P   W   T   Q   R   Y   F   A   K   F   G   N   L   49
181 TAC AAC GCA GCC GCA ATC ATG GGA AAT GCT GAT GTT GCA AAA CAC GGA TCA ATT ATC CTC 240
50  Y   N   A   A   A   I   M   G   N   A   D   V   A   K   H   G   S   I   I   L   69
241 CAC GGT CTG GAC CGG GCT ATG AAG AAC ATG GAC AAC ATC AAG GCG GCC TAT ACC GAT CTA 300
70  H   G   L   D   R   A   M   K   N   M   D   N   I   K   A   A   Y   T   D   L   89
289 AGC ACG CTG CAC TCC GAG ACA CTG CAC GTG GAT CCC GAC AAT TTC AGG CTC CTC TCC GAC 360
90  S   T   L   H   S   E   T   L   H   V   D   P   D   N   F   R   L   L   S   D   109
361 TGC CTG GCC ATT GTG CTC GCT GCT CGG ATG GGC AAA AAC TTC ACT CCT GAA ATC CAG GCC 420
110 C   L   A   I   V   L   A   A   R   M   G   K   N   F   T   P   E   I   Q   A   129
421 ACT ATC CAG AAG TTC ATG GCC GTG GTG GTG TCC GCC CTG GGA AGG CAG TAC CAC TAG AAA 480
130 T   I   Q   K   F   M   A   V   V   V   S   A   L   G   R   Q   Y   H   *   148
481 GGT GCA GCA GAAGAC CAT CAC ACG CTG ATC ACA AAA AAA ATC ATT TTT TTG GTC ATG TCT 540
541 CAG AGG ATG AAT AAAT AA AAG AAT ATG CCC CAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA 599
```

图 1 斜带石斑β-珠蛋白 cDNA 的核苷酸序列

Fig 1 Nucleotide sequence of the orange-spotted grouper hemoglobin β-chain cDNA

方框表示推测的远端组氨酸残基, 黑体表示推测的近端组氨酸残基^[4]

黑斜体部分为 Poly A 信号 AATAAA。该序列 GenBank 登录号为 AY029506。

2.2 斜带石斑β-珠蛋白与其它物种的比较

如图 2 所示。斜带石斑β-珠蛋白的氨基酸序列与草鱼血红蛋白 II 型 β-亚基的同源性最高, 达到 73.0%。与其它鱼类及蛙、鸡、人的同源性见表 1。斜带石斑β-珠蛋白与同属真口鱼纲的草鱼、伯氏固南极鱼、大西洋鲑鱼、金鱼、虹鳟、蓝鳍金枪鱼、电鳗等的同源性较高, 而与肉鳍鱼纲的腔棘鱼和肺鱼及板鳃纲的鲨鱼的同源性较低, 与蛙、鸡及人的同源性也较低。但在血红素结合区及 αβ 链的结合区保守性均较高。

脊椎动物血红蛋白分子由两个 α 亚基和两个 β 亚基组成, 只在红细胞及其祖先细胞内表达。哺乳动物和鸟类存在血红蛋白基因多态性, 在个体发育的不同阶段表达不同^[5]。在鱼类, 1970 年 Riggs 等根据红细胞裂解物的电泳结果推测在真骨鱼可能存在血红蛋白的多态性。其后在虹鳟、草鱼、龙鱼等证实了血红蛋白多态性, 并测定了序列^[6-9]。另外, 在鲑鱼、虹鳟和牙鲆等的不同发育阶段, 证实血红蛋白的电泳结果有差异, 载氧能力也不同^[10]。金鱼和虹鳟突然转移至不同温度时, 血红蛋白的成

表 1 斜带石斑β-珠蛋白与其它物种氨基酸序列的同源性

Tab 1 Amino acid sequence identity of orange-spotted grouperβ-globin to those of other species

种类	珠蛋白	同源性/%
Teleostei		
carp	β3	73.0
	β1,2	58.5
emerald rockcod	β	72.1
rainbow trout	β4	59.2
	β1	57.1
atlantic salmon	β	61.2
goldfish	β	60.5
tuna	β	59.9
electric eel	β	53.7
Sarcopterygii		
lungfish	β	51.7
coelacanth	β	49.0
Elasmobranchii		
shark	β	37.3
frog larval	β	46.3
frog	β	43.2
chicken	β	52.4
human	β	44.9

789; 69—73.

[8] CARUSO C, RUTIGLIANO B, ROMANO M, et al. The he-
moglobins of the cold-adapted Antarctic teleost *Cygnadraco*
mawsoni[J] . *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, 1078: 273
— 282.

[9] VANSTONE W E, ROBERTIS E, TSUYUKI H. Changes in
the multiple hemoglobin patterns of some Pacific salmon, ge-
nus *Oncorhynchus*, during the parr-smolt transformation[J] .
Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1964, 42:
697—703.

[10] MIWA S, INUI Y. Thyroid hormone stimulates the shift of
erythrocyte populations during metamorphosis of the flounder
[J] . *J Experimental Zoology*, 1991 , 259: 445—451.

Cloning and Sequencing of Hemoglobin β-Chain cDNA from Orange spotted Grouper (*Epinephelus coioides*)

YIN Zhi xin, HE Jian guo
(School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Phage clones were randomly selected from leukocytes cDNA library of orange spotted grouper and used as tem-
plates for PCR amplification using λTriplEx 5’&3’ LD Insert Screening Amplimers. Then the expression sequecne tags
(ESTs) were sequenced. The hemoglobin β chain cDNA was isolated from the library. It consists of the longest open
reading frame of 444 bp that encodes of 147 amino acids. Using a computer software (Compute pI MW at
[http: //www.expasy. cn /](http://www.expasy.cn/)), the calculated relative molecular mass of the hemoglobin β chain is 16 544, with the pI of
6. 95. It shows a 73. 0% amino acid sequence identity with common carp beta globin type 3. The distal and proximal
histidine residues at the heme binding region were conserved. The functionally important residues that are involved in the
contacts with the heme and contacts between subunits were highly conserved.

Key words: orange spotted grouper; hemoglobin β chain; expression sequence tags (ESTs); cDNA library

(上接第 57 页)

Effect of Culture Condition on the Growth and Expression of Recombinant *E. coli* (hAGN) and on the Control of Acetate

ZHOU Lian, LUO Jin xian, ZHANG Tian yuan, SUN Ci huang, CHEN Hong
(Key Laboratory of Genetic Engineering of Ministry of Education //
School of Life Sciences, Sun Yat sen University Guangzhou 510275, China)

Abstract: The cultural condition of recombinant *E. coli* (hAGN) was studied. The appropriate host strain, culture
media, and pH was determined and found that the inhibition of acetate on gene expression could be decreased by in-
creasing pH.

Key words: *E. coli*; angiostatin; culture condition; acetate