

虹鳟鱼 *NDK-1* 基因 cDNA 的克隆与序列特征分析

王家庆¹, 刘晓慧², 李代宗¹, 韩进诚³, 郭 冉¹, 王岳鸿¹, 王志平^{1, 4}

(1. 河北农业大学 海洋学院, 河北 秦皇岛 066003; 2. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005;
3. 商丘师范学院 河南 商丘 476000; 4. 渭南师范学院, 陕西 渭南 714000)

摘要: 以虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)为研究材料, 使用 RT-PCR 和 RACE 法分离和克隆了虹鳟鱼 *NDK-1* 基因 cDNA 的全长序列(GenBank 登录号: FJ607868)。序列全长 953 bp, 其中 5'端非翻译区(5'-UTR)长 45 bp, 3'端非翻译区(3'-UTR)长 284 bp, 开放性阅读框(ORF)长 624 bp, 编码 207 个氨基酸。虹鳟鱼 NDPK 蛋白序列与几种脊椎动物台湾樱花钩吻蛙、斑马鱼、西方爪蟾、非洲爪蟾、人和黑青斑河的同源性分别为 95%, 72%, 68%, 68%, 65% 和 64%, 表明 *NDK-1* 基因在进化过程中是高度保守的。

关键词: 虹鳟鱼; *NDK-1* 基因; RT-PCR; RACE

中图分类号: S917 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)04-0070-04

The Cloning and Analysis of *NDK-1* cDNA Derived from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

WANG Jia-qing¹, LIU Xiao-hui², LI Dai-zong¹, HAN Jin-cheng³,
GUO Ran¹, WANG Yue-hong¹, WANG Zhi-ping^{1, 4}

(1. College of Ocean, Hebei Agricultural University, Qinhuangdao 066003, China; 2. College of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361012, China; 3. Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, China; 4. Weinan Normal University, Weinan 714000, China)

Abstract: RT-PCR and RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) methods were used for the isolation of the full-length cDNA of *NDK-1* gene (GenBank accession number: FJ591154) from rainbow trout. Sequence analysis revealed a 953 bp cDNA containing the 45 bp 5'-UTR, 284 bp 3'-UTR and 624 bp ORF encoding 207 amino acids. Sequence alignment of NDPK amino acid between rainbow trout and salmon, zebrafish, western frog, africa frog, human and fugu exhibited 95%, 72%, 68%, 68%, 65% and 64% identity rate, respectively. The result indicated the *NDK-1* gene was highly conservative in the progress of evolution.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*; *NDK-1* gene; RT-PCR; RACE

核苷二磷酸激酶(Nucleoside diphosphate kinase, NDPK)是一种多功能蛋白, 首要功能是维持细胞内 NTP 浓度, 调节细胞增殖、分化、发育和凋亡等多种重要功能^[1-3]。NDPK 通过催化腺苷三磷酸(ATP)和核苷二磷酸(NDP)之间的磷酸基团转移反应来维持生物体细胞内的 NTP 浓度, 其反应方程式为 $ATP + NDP = ADP + NTP$ ^[4]。

虹鳟鱼隶属鲑形目, 鲑科, 鳟属, 俗称鳟鱼, 目前虹鳟鱼的养殖已遍布世界各地^[5]。该鱼属冷水性鱼

类, 具有食用价值高、生长迅速、饲料利用率高、人工繁殖简便易行等优点, 已成为联合国粮农组织向世界推广的产量高而品质优良的四大淡水养殖品种之一。

本试验克隆了虹鳟鱼 *NDK-1* 基因的 cDNA 全长序列, 分析其蛋白(NDPK)序列的功能位点及在物种间同源性, 为进一步研究鱼类细胞内 NTP 浓度的调节机制, 以及 NDPK 对鱼类机体细胞中新陈代谢的调节等生理过程奠定重要理论基础。

收稿日期: 2009-05-12

基金项目: 河北省科技厅科技计划项目资助 (0624240011)

作者简介: 王家庆(1981-), 男, 辽宁海城人, 硕士, 讲师, 主要从事海洋动物分子生物学及生物信息学研究。

1 材料和方法

1.1 试验动物

虹鳟鱼购自海产品集贸市场, 运回后立即进行脑总 RNA 抽提。

1.2 试剂

Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司; T4DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、克隆载体 pMD-T-RT-PCR 试剂盒为宝生物工程有限公司 (TaKaRa) 产品; 特异引物由 TaKaRa 公司合成; mRNA 分离纯化系统 (PolyAT tract mRNA Isolation System) 为 Promega 公司产品; RACE 试剂盒为 Invitrogen 产品。

1.3 总 RNA 的提取

取虹鳟脑组织, 用 Trizol Reagent 按说明书进行抽提总 RNA。用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.4 引物合成

从 NCBI 的 GenBank 数据库中下载几种动物 *NDK-1* 基因的编码序列, 台湾樱花钩吻鲑 (*Onchorhynchus masou formosanus*, AC168230)、黑青斑河 (*Tetraodon nigroviridis*, CAG12673)、斑马鱼 (*Danio rerio*, AAH49030) 等动物 *NDK-1* 基因序列, 根据序列保守性, 设计基因保守区的 RT-PCR 引物 P1-F 和 P1-R, 序列如下:

P1-F: 5'-TTGAAATAATGGTTA/CTATTTCAA-3';
P1-R: 5'-TTCTCAAAGCTG/CAACAGGAACT-3'。

1.5 虹鳟 *NDK-1* 基因的全长 cDNA 克隆

cDNA 的合成按反转录 PCR 扩增 (RT-PCR) 试剂盒说明书步骤进行。获得的 RT-PCR 产物片段, 使用 T 载体克隆法克隆 PCR 产物, 阳性克隆送 Takara 公司测序。测序结果经 BLAST 检索 NCBI 序列数据库, 确定所克隆序列为虹鳟鱼 *NDK-1* 基因编码序列。根据对 RT-PCR 片段的序列测定结果, 合成 P2 和 P3 引物, 分别用于克隆 cDNA 的 5' 和 3' 端的序列, 引物序列如下:

P2: 5'-TGGTTTCACTGCAATAAGAGTACG-3';
P3: 5'-CATCTGAGGCCCAAGCAGGCACT-3'。

5' RACE 和 3' RACE 具体步骤均按 GeneRacer Kit (Invitrogen) 的说明书操作, PCR 产物回收后经 T 载体克隆、测序, 并与已克隆测序的 *NDPK* 基因编码区序列拼接, 从而获得全长的 cDNA 序列。

1.6 虹鳟 *NDK-1* 基因编码蛋白质 (NDPK) 基本理化性质分析

在线工具 ExPASy-ProtParam 和 SeqFacts 预测蛋白质的基本理化性质。利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/IMHMM-2.0/> 进行蛋白质序列的跨膜区分析; 利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 进行蛋白质序列的信号肽分析; 利用 Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastp>) 进行氨基酸序列同源性分析。利用基于神经网络建模方法的 CPHmodels 软件 (网址: <http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>), 对 NDPK 的空间结构进行分析, rasmol 软件查看预测的三维结构模型。

dk/services/IMHMM-2.0/ 进行蛋白质序列的跨膜区分析; 利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 进行蛋白质序列的信号肽分析; 利用 Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastp>) 进行氨基酸序列同源性分析。利用基于神经网络建模方法的 CPHmodels 软件 (网址: <http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>), 对 NDPK 的空间结构进行分析, rasmol 软件查看预测的三维结构模型。

2 结果与分析

2.1 虹鳟 *NDK-1* 基因的克隆和分析

用 *NDK-1* 基因保守区引物 P1-F 和 P1-R, 通过 RT-PCR 扩增后获得约 600 bp 的产物, 经 T 载体克隆测序后的测序结果经 BLAST 检索序列数据库发现, 该序列包括完整的开放阅读框 (ORF) 并且与台湾樱花钩吻鲑 *NDK-1* 基因的同源性高达 98%, 与斑马鱼和黑青斑河部分序列的同源性均在 75% 左右, 确定该片段为虹鳟 *NDK-1* 基因的编码序列。分别利用该序列设计特异的 5' RACE 引物 P2 和 3' RACE 引物 P3, 用于克隆基因的 5' 和 3' 端序列。经 5' 和 3' RACE 分别获得大小在 250 bp 和 450 bp 左右的 PCR 产物, 克隆测序发现, 5' 和 3' 端序列与虹鳟 *NDK-1* 基因编码序列有重叠, 为 *NDK-1* 基因 mRNA 的 5' 和 3' 端序列, 3 个序列经序列组装软件拼接后得到虹鳟 *NDK-1* 基因全长 cDNA 序列 (图 1), 提交到 GenBank 获得登录号: (FJ607868)。

```

TTGAAGAATATCAAGTCGATTAACTTTGGTTTGTGAAATA
ATGTTTATATTTCAAAGTGTGCGCTGAAAACCTTATCTGCGAGTCTTACTTGGGGTTGCGGAGTT
M V I F Q R C A L K N L I L P S P Y C R G W G V
CTACCCAGCGAGTAAAGTTATATCACTGAGTTGCGATTTTCTCTCTCTGCGCATGATGCACTGCGATG
L P A S K S Y I T E F A F F L L L G H R C T G Y
AGTACCATATCAGGGATGCTGCTGTTGAGAGAACGTACTCTTATTGCGAGTGAACCCAGATGGGGTCCAGG
S T I S G I P G V R E R T L I A V K P D G V Q R
CQCTTTGTGGCAGATAATGCAACGCTTTTGAGCAGAGAGGCTTCAAACTGCTGGCATGAAGATCTCGAG
R L V G Q I M Q R F E Q G R F K L V G M K M L Q
GCATCAGAGGAGCTGCTCTCTCAACCACTACAGGAGTAAAGGAGGAGCGCTTTTAAOCCAGCTCTGTGAC
A S E E L L S Q H Y Q E L R R K P F Y P S L L Y
TACATGACCTCTGCTGCCATAGTTGTTTATGTTGTTGGAGGGTCAATAATGTTGCTGGCATGCGGATCATG
Y M T S G P I V V M V W E G H N V V R T S R I M
GTAGGACACACCAACCATCTGAGGCGCAAGCAGGCACTGTCGGGGGATTTCAGCATTCACATCAGCAGGA
V G D T N P S E A Q A G T V R G D F S I H I S R
AATGTGCTGCTGAGTATTCAGTACAGGCGGCTCAGAGGAGATGACGCTGTGTTTCATCGAAAGGAA
N V V H A S D S V E G A Q R E I Q L W F H R K E
CTGATGATTGGACCTCTATGACACCAATACCACTACAGCTTTTGAACAGAGATGCAAGGCAGAGATTG
L N D W D C Y D H N S T Y Q L *
AAAGAGAGTGTGAACAAGTTCCTGTTTCTTGACCACTTCTGCTGCCAGACCGCGAGCGCTGCCCGCTGTC
TGTAACCTTGTCACACACACATAGATTATGACCTGCTGCTGCCCTGAGACATACATGCGCTGCTGACCTTTT
GAATTCGTGATCTGGATTACTGACCTCTGTCTGCGCTTGACCTGTCTATTGTGCTGCGCTGTGTCTAGAAAT
AAATTTTGTCACTTGGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA
*表示终止密码子; 3'端 Poly(A)信号(AATAAA)用加粗斜体字母表示。
* Represents stop codon; The italic and bold letters (AATAAA) indicate the
polyadenylation signal.
```

图 1 虹鳟鱼 *NDK-1* cDNA 及其推导的氨基酸序列
Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequences of the rainbow trout *NDK-1* gene

2.2 虹鳟鱼 *NDK-1* 基因编码蛋白质 (NDPK) 序列分析

虹鳟鱼 *NDK-1* cDNA 全长 953 bp, 其中 5' 端非翻译区 (5' UTR) 长 45 bp, 3' 端非翻译区 (3' UTR) 长 284 bp, 开放阅读框长 624 bp, 编码 207 个氨基酸。

关于 NDPK 蛋白结构研究, 利用传统的思路需进行表达、纯化、结晶和核磁共振或者 X 射线衍射来获得三维结构信息。目前, 随着大量的蛋白结构的阐明, 出现了很多结构建模的方法, 本研究对 NDPK 三级结构的同源建模, 是基于目标蛋白与所选取的模板蛋白序列同源性(73.8%)很高基础之上的, 因此所预测的三维结构能很准确地反映 NDPK 蛋白的真实结构。

最近研究发现,NDPK 以其催化磷酸基团转移为基础,可能参与 DNA 损伤的修复,与 AMP 激酶、蛋白激酶 CK2 相互作用,能调节 G 蛋白活性和稳定性,利用 NDPK 的磷酸转移酶活性,可以开发抗病毒增敏药物,除此之外,NDPK 还可以作为抗癌药物增效剂、白血病标志物,或者开发为新药靶等^[8,9]。因此,本试验下一步的工作是在进一步对 NDPK 蛋白进行表达与纯化的基础上,研究 NDPK 的生物学活性具有重要的理论与实践意义。

参考文献:

[1] Tee Y T, Chen C D, Lin L Y, *et al.* Nm23-H1: ametastasis-associated gene [J] . Taiwan J Obstet Gynecol, 2006, 45 (2): 1007—1013.

[2] Ma D, Xing Z, Liu B, *et al.* NM23-H1 and NM23-H2 repress transcriptional activities of nuclease-hypersensitive elements in the platelet-derived growth factor-A promotor [J] . J Biol Chem, 2002, 277 (2): 1560—1567.

[3] Narayanan R, RamaswamiM. Regulation of dynamin by nucle-

oside diphosphate kinase [J] . J Bioenerg Biomembr, 2003, 35 (1): 49—55.

[4] Berg P, Joklik W K. Transphosphorylation between nucleoside polyphosphates [J] . Nature, 1953, 172 (4387): 1008—1009.

[5] Nichols K M, Young W P, Danzmann R G, *et al.* A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J] . Animal Genetics, 2003, 34(2): 102—115.

[6] Chiadmi M, Morera S, Lascu I, *et al.* Crystal structure of the Awd nucleotide diphosphate kinase from *Drosophila* [J] . Structure, 1993, 1 (4): 283—293.

[7] 黎军胜, 李建林, 吴婷婷. 罗非鱼胰蛋白酶 II cDNA 克隆与序列分析 [J] . 南京农业大学学报, 2005, 28(1): 139—142.

[8] Kaetzel D M, Zhang Q, Yang M, *et al.* Potential roles of 3'-5' exonuclease activity of NM23-H1 in DNA repair and malignant progression [J] . J Bioenerg Biomembr, 2006, 38 : 163—167.

[9] Wieland T. Interaction of nucleoside diphosphate kinase B with heterotrimeric G protein beagamma dimers: consequences on G protein activation and stability [J] . Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2007, 374 : 373—383.