

文章编号:1000-0615(2009)05-0719-08

## 条斑紫菜泛素结合酶基因的 cDNA 序列克隆与分析

易乐飞<sup>1</sup>, 刘楚吾<sup>2</sup>, 王萍<sup>1</sup>, 周向红<sup>1</sup>

(1. 淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088)

**摘要:**泛素—蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasomes system, UPS)是真核生物重要的翻译后修饰系统,参与了许多重要的生理反应,同时也参与了蛋白质的质量控制和细胞的稳态维持,因此研究条斑紫菜 UPS 有助于阐明条斑紫菜在逆境胁迫下通过 UPS 降解异常蛋白和调节蛋白的生物学活性。泛素结合酶(ubiquitin-conjugating enzyme, E2)是 UPS 的重要组成部分。根据电子克隆结果指导 RT-PCR 实验,成功克隆了条斑紫菜泛素结合酶基因(PyE2)的 cDNA 序列(GenBank accession: FJ232910)。该 cDNA 序列含有长 444 nt 的完整 ORF, 编码蛋白(PyE2)的分子量 16.6 ku, 长 147 AA。PyE2 与其它物种的 E2 具有高度的一致性和相似性,反映出 E2 在进化上相当保守。PyE2 含有 E2 活性位点的保守序列及半胱氨酸残基,其三维结构与人的 I 类 E2 高度一致。PyE2 不含 C 端和 N 端延伸结构,所以在条斑紫菜 E2 家族中属于 I 类 E2。

**关键词:**条斑紫菜;泛素结合酶;克隆;生物信息学

**中图分类号:**S 917; Q 559+.2; Q 785

**文献标识码:**A

大量研究表明泛素—蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasomes system, UPS)是真核细胞内十分重要的细胞功能调控系统,可以精确地选择性降解蛋白质;UPS 能够快速、及时、单向地催化多种生物学过程,包括细胞周期、DNA 修复、细胞死亡(如凋亡)、信号传导、转录、新陈代谢、免疫、胁迫响应、蛋白质稳态等<sup>[1-5]</sup>。泛素(ubiquitin)需经过一系列的酶反应才能与靶蛋白共价结合。首先,泛素激活酶(ubiquitin-activating enzyme, UBA 或 E1)以 ATP 依赖性方式激活泛素,在泛素和 E1 之间形成高能硫酯键;然后,激活的泛素从 E1 转移到泛素结合酶(ubiquitin-conjugating enzyme, UBC 或 E2)上,在泛素和 E2 之间也形成类似的高能硫酯连接;最后, E2 可直接,也可在泛素蛋白连接酶(ubiquitin-protein ligase, E3)参与下,将泛素的 C-末端甘氨酸残基与靶蛋白的赖氨酸残基的  $\epsilon$ -氨基基团共价连接;重复上述反应,在已结合到靶蛋白的泛素上继续

催化,并形成多泛素链(polyubiquitin chain)。大部分被多泛素链标记的靶蛋白随后被 26S 蛋白酶体(proteasome)降解<sup>[6-7]</sup>。其中, E2 是 UPS 的重要组成部分,对泛素化修饰的特异性和精确时空性起关键作用<sup>[2]</sup>。目前已在多种生物中克隆了该酶的 cDNA 序列,例如在 GenBank 中登录的酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) E2 有 13 种,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)有 17 种。然而目前尚无条斑紫菜(*Porphyra yezoensis* Ueda)的相关报道。

条斑紫菜是我国重要的海水养殖种类之一,随着养殖规模逐步扩大,条斑紫菜养殖面临着环境恶化和病害频发的局面,暴露出条斑紫菜基础研究相对薄弱的问题。2004 年 5 月召开的“海洋生物基因资源的研究与利用”科学会议<sup>[8]</sup>指出,为了解决水产养殖的“质”、“量”和“病”的问题,必须对功能基因进行深入研究。因此本文利用生物信息学技术指导实验,克隆了条斑紫菜泛素结合酶基因(PyE2)的 cDNA 序列,并对其序列进行

了分析;有助于进一步研究条斑紫菜在高温、干出、重金属、环境污染等逆境下通过 UPS 降解异常蛋白和调节蛋白的生物学活性;本文的技术路线也可为条斑紫菜功能基因的快速克隆以及进一步开发、利用条斑紫菜资源奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 电子克隆

以拟南芥 *E2* 的氨基酸序列 (GenBank accession: AAM63316) 作为查询序列,使用 tBlastn 程序<sup>[9]</sup>检索 GenBank 中条斑紫菜表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 数据库 (dbEST)。将检索到的相似性高且含有 *E2* 保守序列的 EST 序列作为种子序列,接着用 Blastn 程序<sup>[9]</sup>去检索条斑紫菜 dbEST,将检索到的 EST 序列用 CAP3 程序<sup>[10]</sup>组装和延伸。重复检索、延伸步骤直到不能延伸为止,最后得到 *PyE2* cDNA 的叠连群 (contig)。

### 1.2 实验克隆

**实验材料和主要试剂** 条斑紫菜叶状体采集于连云港近海海域。TRIzol 试剂购于 Invitrogen,反转录试剂盒购于 MBI Fermentas, *Taq Plus I* (*Taq + Pfu*) 购于 Bio Basic Inc.,引物由上海生工合成。

**条斑紫菜叶状体总 RNA 分离** 条斑紫菜叶状体总 RNA 抽提参考 TRIzol 试剂说明书,稍作改动。在氯仿抽提之前增加一次离心;将异丙醇沉淀改为 1:1 (v/v) 的异丙醇和高盐溶液 (含 1.2 mol/L 氯化钠和 0.8 mol/L 柠檬酸钠) 沉淀。电泳检测 RNA 的完整性,核酸蛋白定量检测仪检测 RNA 的含量和纯度。

**引物设计** 根据电子克隆得到的 contig 序列设计下列引物:上游引物 5'-CTCTGCCGCTGG AGTATCGT-3',下游引物 5'-CTCACAAGAGCA GCACCAGTA-3'。预计扩增片段长 553 bp,且包含 *PyE2* 的完整开放阅读框 (open reading frame, ORF)。

**RT-PCR 反应与测序** 取 2  $\mu\text{g}$  总 RNA,以 Oligo (dT) 为引物,用 MBI 的第一链 cDNA 合成试剂盒,按说明书的反应条件合成单链 cDNA。PCR 反应体系为 50  $\mu\text{L}$ ,其中含 5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PCR 反应缓冲液,2 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ,200  $\mu\text{mol/L}$  dNTP,

上下游引物各 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ,3 U *Taq Plus I*,1  $\mu\text{L}$  RT 产物为模板。反应条件为 95  $^\circ\text{C}$  预变性 3 min,然后 30 个循环,每个循环 95  $^\circ\text{C}$  变性 30 s,55  $^\circ\text{C}$  退火 30 s,72  $^\circ\text{C}$  延伸 40 s,最后 72  $^\circ\text{C}$  充分延伸 5 min,反应后取 1  $\mu\text{L}$  电泳。将 PCR 产物送上海生工进行正反双向测序,获得 *PyE2* 的 cDNA 序列。

### 1.3 生物信息学分析

分析测序结果,推导 ORF 及编码蛋白 (*PyE2*) 的氨基酸序列,利用 ProtParam<sup>[11]</sup> 进行 *PyE2* 的各种基本理化特性分析,以 *PyE2* 为探针,对 GenBank 中的非冗余的蛋白质数据库进行 BlastP<sup>[9]</sup> 分析,使用 ClustalW 程序<sup>[12]</sup> 进行多序列比对,使用 ScanProsite<sup>[13]</sup> 和 CDD<sup>[14]</sup> 进行功能结构域分析,使用 Swiss-model<sup>[15]</sup> 和 BioDesigner<sup>[16]</sup> 进行三维结构预测与三维结构比对,进而判断该蛋白是否为新序列,并推导蛋白质功能。

## 2 结果

### 2.1 *PyE2* 的电子克隆

用 AAM63316 对条斑紫菜的 dbEST 进行 tBlastN 分析,选出高度相似并且含有 *E2* 保守序列的一条条斑紫菜 EST。再以该 EST 序列为种子序列检索条斑紫菜 dbEST,收集符合聚类条件的 EST (聚类条件是 2 条 EST 序列的重叠区超过 40 nt,且该区域的碱基一致性大于 94%<sup>[17]</sup>),然后将这些 EST 拼接。重新检索、拼接,直至获得的序列长度不能用此法继续延伸为止,最后共获得了 7 条 EST 序列 (GenBank accession: AV438053、AU188725、AV436414、AV438411、AU192883、AV435890、AV438115),拼接出一条长 641 bp 的 contig。

### 2.2 条斑紫菜叶状体总 RNA 的提取

取 TRIzol 试剂提取的条斑紫菜叶状体总 RNA 2  $\mu\text{L}$  在 70  $^\circ\text{C}$  水浴中温浴 1 h 后与 -20  $^\circ\text{C}$  保存的 RNA 一起电泳检测,电泳图 (图 1) 显示了清晰的 25S 和 18S 两条 rRNA 条带,经温浴处理后的 RNA 与未处理并无明显差异,说明 RNA 样品中没有残留的 RNase 污染。核酸蛋白定量检测仪测量结果显示,RNA 样品的  $A_{260}/A_{230} = 2.113$ 、 $A_{260}/A_{280} = 2.134$ ,浓度为 1 020.8 ng/ $\mu\text{L}$ 。上述检测结果表明总 RNA 质量良好,适于进行后续反应。

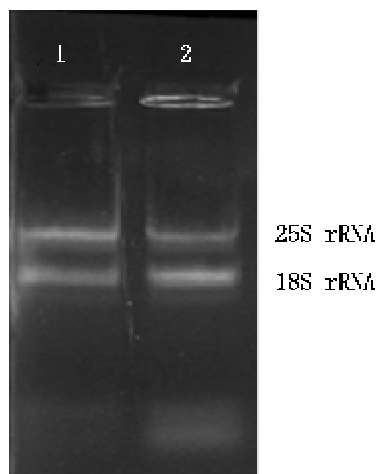


图1 条斑紫菜叶状体总 RNA 的电泳  
1:电泳前-20℃保存的总RNA;2:电泳前70℃温浴1h的总RNA

Fig.1 Ge1 electrophoresis of total RNA extracted from *Porphyra yezoensis*

1: Total RNA stored at -20℃ before electrophoresis; 2: Total RNA incubated at 70℃ for 1 h before electrophoresis

### 2.3 RT-PCR 与测序结果

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析呈现出一条长约 550 bp 的特异性条带(图 2),与预期设计的 553 bp 的扩增片段相符。双向测序获得了 *PyE2* cDNA 序列(GenBank accession: FJ232910)。*PyE2* cDNA 序列与电子克隆所得 contig 序列比

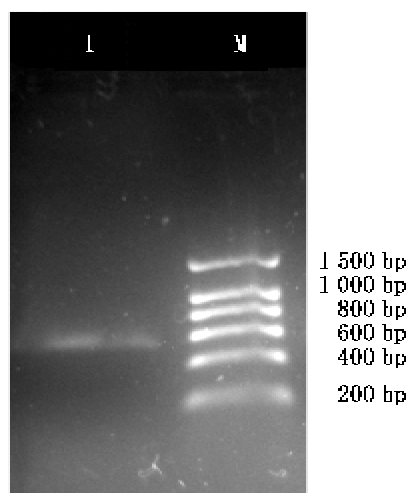


图2 *PyE2* 的 PCR 扩增产物电泳

1:*PyE2* 的 PCR 扩增产物,扩增产物大小约 550 bp;M:DNA Marker E

Fig.2 Ge1 electrophoresis of PCR product

1: PCR product of *PyE2*. The product was about 550 bp; M: DNA Marker E

对结果表明两者的差异碱基仅 2 个,一致性达 99.62%。*PyE2* cDNA 序列编码一个含 147 AA 的蛋白质序列,与电子克隆的相应蛋白质序列的比对结果显示差异残基仅 1 个,一致性达 99.32%。如果将个体间多态性和 EST 固有的错误率等因素考虑进去,测序所得序列与电子克隆所得对应序列是一致的。

### 2.4 *PyE2* cDNA 序列的生物信息学分析

ORF Finder 程序在 *PyE2* cDNA 序列的第 78 ~ 521 nt 处发现有一连续 ORF,第 78 ~ 80 nt 处是该 cDNA 序列的第一个 ATG 密码子,其下游的 +4 位是 G,上游 -3 位是 A,符合 kozak 规则,且同一读码框上游存在终止密码子,再结合推导的氨基酸序列 N 端同源性比较结果,可以认定第一个 ATG 是该基因的起始密码子<sup>[18]</sup>。因此本文克隆得到的 cDNA 序列含有完整的 ORF,编码一个长 147 AA 的蛋白序列。

ProtParam 对 *PyE2* 的分析表明:分子量大小为 16.6 ku,其碱性氨基酸(K、R)、酸性氨基酸(D、E)、疏水性氨基酸(A、I、L、F、W、V)和极性氨基酸(N、C、Q、S、T、Y)含量分别为 15、16、44 和 44 个,等电点为 pH 6.3。

以 *PyE2* 为探针对 GenBank 中的非冗余蛋白质数据库进行 Blastp 分析,结果发现日本洞毛藻(*Griffithsia japonica*)、水稻(*Oryza sativa*)、拟南芥、酿酒酵母、斑马鱼(*Danio rerio*)、小鼠(*Mus musculus*)等多种动植物和微生物的 *E2* 与该蛋白序列具有极高的相似性(similarity),但在条斑紫菜的蛋白质数据库没有找到与之高度相似的序列。

将上述生物的 *E2* 与 *PyE2* 进行多序列比对,结果(图 3)表明在进化上 *PyE2* 与同属红藻的日本洞毛藻的 *E2* 距离最近。*PyE2* 与日本洞毛藻、水稻、拟南芥、酿酒酵母菌、斑马鱼和小鼠的序列一致性(identity)分别为 91%、77%、76%、76%、82% 和 79%;若考虑功能相似氨基酸之间的保守替换(A = G = P = S = T, H = R, F = W = Y 和 I = L = M = V),那么 *PyE2* 与它们的序列相似性分别为 96%、92%、91%、93%、90% 和 89%。*PyE2* 与其它物种的 *E2* 在蛋白质水平上表现较高的相似性,说明 *E2* 基因家族在动植物和微生物中具有高度的保守性。

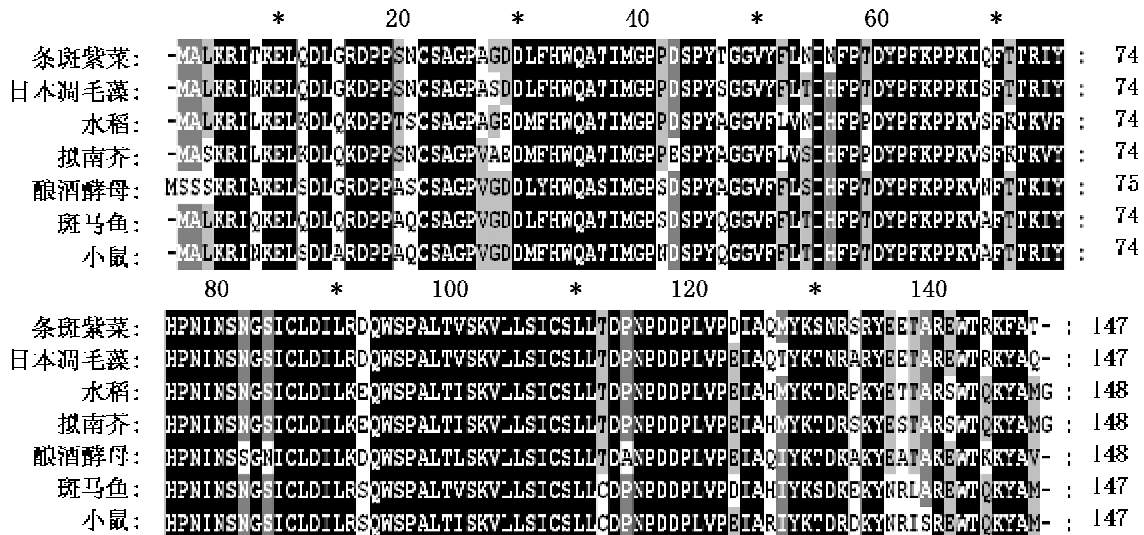


图3 E2的多序列比对

来自条斑紫菜、日本洞毛藻、水稻、拟南芥、酿酒酵母、斑马鱼和小鼠的E2用ClustalW构建了多序列比对

Fig. 3 Multiple alignment of E2

The alignment of E2 was performed with the ClustalW method. The source organisms for E2 sequences were as follows: *P. yezoensis*, *G. japonica*, *O. sativa*, *A. thaliana*, *S. cerevisiae*, *D. rerio* and *M. musculus*

ScanProsite 和 CDD 对 PyE2 保守结构域的分析结果(图4)显示 PyE2 第4~136位属于泛素结合酶家族,第74~89位为泛素结合酶活性位点并具有下列保守序列 [FYWLSP]-H-[PC]-[NHL]-[LIV]-x(3,4)-G-x-[LIVP]-C-[LIV]-x(1,2)-[LIVR],其中活性位点中的半

胱氨酸位于第85位,其功能是与泛素形成高能硫酯键进而参与将泛素转移到E3酶或靶蛋白上的反应。酶活性位点的15个氨基酸残基和第85位的半胱氨酸残基与其他物种的E2对应序列完全匹配。



图4 PyE2的功能结构域

Fig. 4 Functional domains prediction of PyE2

三维结构(图5)显示,PyE2仅包含一个功能结构域,该结构域由1个4链反平行β片层、4个α螺旋和一个短的310螺旋组成。β片层和α2螺旋构成中心区,α1螺旋和α2/α3螺旋位于两侧。活性位点上的半胱氨酸残基处在连接β4和α2的长环上,位于蛋白质的浅表凹陷中。与人(*Homo sapiens*)的I类E2<sup>[19]</sup>相比,除了N-端和C-末端序列,两者有相似的三维结构。

### 3 讨论

UPS是真核生物重要的翻译后修饰系统。

靶蛋白的多泛素化可引导26S蛋白酶体降解靶蛋白,这种及时的选择性降解在细胞的许多代谢过程中起关键作用,如参与细胞周期调控、信号传导、应急反应、受损或错误折叠蛋白的去除以及DNA修复等。靶蛋白的单泛素化则以非水解的方式调节靶蛋白的生物学活性,如参与靶蛋白的稳定性,使靶蛋白重折叠及易位、染色体结构改变、基因修复、复制及表达调节等<sup>[20]</sup>。因此研究条斑紫菜UPS组成成份和作用途径具有重要的理论和实践价值,特别是对研究条斑紫菜抗逆具有重要的实践价值。

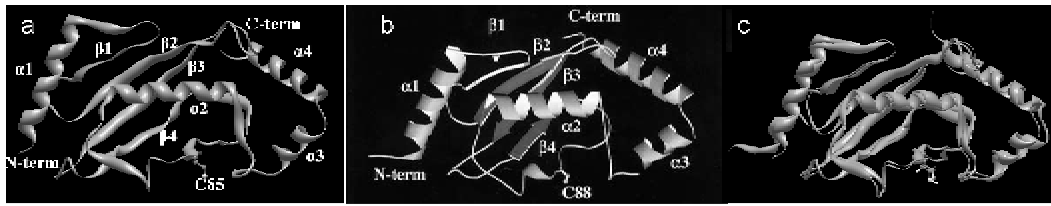


图5 *PyE2* 的三维结构以及 *PyE2* 与人 I 类 *E2* 的空间结构比对

a 和 b 分别是 *PyE2* 和人 I 类 *E2* 的三维结构, N 端、C 端和二级结构进行了标记; c 是 *PyE2* 与人 I 类 *E2* 空间结构的比较。活性位点上的半胱氨酸残基以棍棒模式表示

Fig. 5 Tertiary structure of *PyE2* and structural comparison between *PyE2* and class I *E2* from *H. sapiens*

a and b show ribbon diagram of *PyE2* and class I *E2* of human respectively. The N-terminal, C-terminal and secondary structure features are labeled; c Overlay of the  $C\alpha$  traces of *PyE2* and class I *E2* of human. The active-site residue (Cys) is shown as a stick model

研究表明 UPS 广泛参与植物对逆境的适应过程, *E2* 可充当转录因子与苯丙氨酸解氨酶等防御反应基因启动子上特定的顺式作用元件结合, 实现对植物防御反应的调节。 *E2* 存在着种类和功能多样性, 在逆境作用下 *E2* 基因表现出下调或上调等不同的表达方式<sup>[21]</sup>。因此条斑紫菜不同 *E2* 成员的克隆与功能鉴定有待于进一步研究。

泛素只有经过一系列的酶促级联反应后才能与细胞内的结构或调节蛋白结合, *E2* 是这个酶促级联反应的重要组分。在所有的真核细胞中都发现了多种 *E2*, 例如人至少有 30 种 *E2*, 多样性的 *E2* 对于靶蛋白的特异性选择具有重要作用。 *E2* 根据其结构和功能大致可以分为 4 类<sup>[20, 22-24]</sup>: I 类 *E2*, 由长 150 AA 的保守催化结构域(UBC)组成, 在许多短命蛋白和异常蛋白的泛素依赖性降解中起重要作用; II 类 *E2*, 含催化结构域和一个 C-末端延伸结构, 其 C-末端延伸结构具有多种功能, 如参与靶蛋白识别、与 *E3* 酶互作、参与 N-末端规则(N-end rule)依赖性蛋白水解途径; III 类 *E2*, 含催化结构域和一个 N-末端延伸结构, 其 N-末端延伸结构的功能还不清楚; IV 类 *E2*, 同时含有催化结构域、C-末端延伸结构和 N-末端延伸结构。 *PyE2* 与其它物种的 *E2* 具有极高的相似性和相似的三维结构, 含有 *E2* 的保守催化结构域、活性位点及半胱氨酸残基, 但不含 C-末端延伸结构和 N-末端延伸结构。因此 *PyE2* 属于条斑紫菜 I 类 *E2*。

条斑紫菜不仅经济价值高, 而且还是海洋生物学研究的模式植物<sup>[25]</sup>, 有着重要的理论和实践研究价值, 其功能基因克隆也逐渐展开。早在

1994 年 Reynolds 等<sup>[26]</sup>就克隆了条斑紫菜硫氧还原蛋白基因。此后, 国内外学者相继克隆了一批条斑紫菜的新功能基因, 例如, Kakinuma 等<sup>[27-28]</sup>通过构建消减 cDNA 文库分离了一些有性生殖相关基因、硝酸盐转运基因和尿素转运基因, Fukuda 等<sup>[29]</sup>从条斑紫菜基因组文库中分离得到了翻译延伸因子 1 $\alpha$  基因, Kitade 等<sup>[25, 30-31]</sup>和马凌波等<sup>[32]</sup>通过构建条斑紫菜叶状体 cDNA 文库分别克隆了液泡型的  $H^+$ -ATPase 的 C 亚基基因、4 种肌动蛋白基因和抗坏血酸过氧化物酶基因、Gong 等<sup>[33]</sup>利用简并 PCR 和反向 PCR 技术克隆了条斑紫菜  $\beta$ -微管蛋白基因。但是, 目前在 GenBank 上记录的含完整编码区(complete cds)的条斑紫菜功能基因不过 70 条, 而且其中大多数是核糖体蛋白基因, 相对于拟南芥等模式植物而言, 已克隆功能基因还相当少。因此如何快速分离条斑紫菜功能基因至关重要。分离功能基因既快速又便捷的方法之一是对现有生物信息数据进行电子克隆。Nikaido 等<sup>[34]</sup>和 Asamizu 等<sup>[35]</sup>分别报道了 10 154 条和 10 625 条条斑紫菜 EST, 使电子克隆成为可能。例如, 参与条斑紫菜抗逆的钙调素基因<sup>[36]</sup>和 Lipocalin 基因<sup>[37]</sup>都是通过电子克隆快速获得的。

电子克隆技术以数学算法为手段, 以计算机和互联网为工具, 利用现有的生物信息数据库, 能快速获得新基因序列并能分析其功能特征, 为新基因的实验研究提供了重要指导, 对进一步研究基因蛋白家族组成、结构及其功能都具有重要的理论和现实意义, 为功能基因组学与蛋白质组学研究提供新的线索和基础。目前在各种生物中都有电子克隆的成功报道, 如大肠杆菌(*Escherichia coli*)  $NAD^+$ / $NADP^+$  依赖性琥珀酸半醛脱氢酶基

因<sup>[38]</sup>、蚯蚓(*Eisenia foetida*) *Efp-0* 基因<sup>[39]</sup>、小鼠 *Muc5b* 基因<sup>[40]</sup>和人的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因<sup>[41]</sup>等。与传统基因克隆方法的繁杂、耗时和低效相比,电子克隆更为快速、精确且目的性强。随着更多海洋生物测序的开展以及各类数据库的不断完善,电子克隆技术必将成为海洋生物新基因克隆的重要手段之一。

#### 参考文献:

- [1] Hershko A, Ciechanover A, Varshavsky A. Basic medical research award, The ubiquitin system [J]. *Nat Med*, 2000, 6(10): 1073-1081.
- [2] Pickart C M. Mechanisms underlying ubiquitination [J]. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 503-533.
- [3] Weissman A M. Themes and variations on ubiquitylation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(3): 169-178.
- [4] Sherman M Y, Goldberg A L. Cellular defenses against unfolded proteins; a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases [J]. *Neuron*, 2001, 29(1): 15-32.
- [5] Yoshida Y. A novel role for N-glycans in the ERAD system [J]. *J Biochem*, 2003, 134(2): 183-190.
- [6] Tanaka K, Suzuki T, Hattori N, *et al.* Ubiquitin, proteasome and parkin [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1695(1-3): 235-247.
- [7] Pickart C M, Eddins M J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1695(1-3): 55-72.
- [8] 韩存志. 海洋生物基因资源的研究与利用——香山科学会议第 225 次学术讨论会综述[J]. *科技政策与发展战略*, 2004, (8): 6-11.
- [9] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [10] Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program [J]. *Genome Res*, 1999, 9(9): 868-877.
- [11] Wilkins M R, Gasteiger E, Bairoch A, *et al.* Protein identification and analysis tools in the ExPASy server [J]. *Methods Mol Biol*, 1999, 112: 531-552.
- [12] Fukami-kobayashi K, Saito N. How to make good use of CLUSTALW [J]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 2002, 47(9): 1237-1239.
- [13] De C E, Sigrist C J, Gattiker A, *et al.* ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(suppl\_2): 362-365.
- [14] Marchler-bauer A, Anderson J B, Cherukuri P F, *et al.* CDD: a Conserved Domain Database for protein classification [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(Database issue): 192-196.
- [15] Schwede T, Kopp J, Guex N, *et al.* SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3381-3385.
- [16] Molecular modeling and Visualization [CP/OL]. <http://www.pirx.com/biodesigner/index.shtml>.
- [17] 张利达, 袁德军. 一种新的 EST 聚类方法[J]. *遗传学报*, 2003, 30(2): 147-153.
- [18] 王冬冬, 朱延明, 李 勇, 等. 电子克隆技术及其在植物基因工程中的应用[J]. *东北农业大学学报*, 2006, 37(3): 403-408.
- [19] Miura T, Klaus W, Ross A, *et al.* The NMR structure of the class I human ubiquitin-conjugating enzyme 2b [J]. *J Biomol NMR*, 2002, 22(1): 89-92.
- [20] 陈建明, 余应年. 真核泛素缀合途径研究进展[J]. *中国病理生理杂志*, 2000, 16(2): 175-178.
- [21] 赖 燕, 徐 波, 林 明, 等. 辣椒泛素交联酶 cDNA 的分离及其在 UV-B 作用下的表达分析[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2008, 37(2): 162-165.
- [22] Plafker S M, Plafker K S, Weissman A M, *et al.* Ubiquitin charging of human class III ubiquitin-conjugating enzymes triggers their nuclear import [J]. *J Cell Biol*, 2004, 167(4): 649-659.
- [23] Matuschewski K, Hauser H P, Treier M, *et al.* Identification of a novel family of ubiquitin-conjugating enzymes with distinct amino-terminal extensions [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(5): 2789-2794.
- [24] Jentsch S. The ubiquitin-conjugation system [J]. *Annu Rev Genet*, 1992, 26: 179-207.
- [25] Kitade Y, Yamazaki S, Watanabe T, *et al.* Structural features of a gene encoding the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase c subunit from a marine red alga, *Porphyra yezoensis* [J]. *DNA Res*, 1999, 6(5): 307-312.
- [26] Reynolds A E, Chesnick J M, Woolford J, *et al.*

- Chloroplast encoded thioredoxin genes in the red algae *Porphyra yezoensis* and *Griffithsia pacifica*: evolutionary implications [J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 25: 13–21.
- [27] Kakinuma M, Kaneko I, Coury D A, *et al.* Isolation and identification of gametogenesis-related genes in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) using subtracted cDNA libraries [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2006, 18: 489–496.
- [28] Kakinuma M, Coury D A, Nakamoto C, *et al.* Molecular analysis of physiological responses to changes in nitrogen in a marine macroalga, *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2008, 24: 629–639.
- [29] Fukuda S, Kitade Y, Miyamoto H, *et al.* Isolation and characterization of an elongation factor-1 $\alpha$  gene in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2003, 15: 81–86.
- [30] Kitade Y, Fukuda S, Nakajima M, *et al.* Isolation of a cDNA encoding a homologue of actin from *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2002, 14: 135–141.
- [31] Kitade Y, Nakamura M, Uji T, *et al.* Structural features and gene-expression profiles of actin homologs in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) [J]. *Gene*, 2008, 423(1): 79–84.
- [32] 马凌波, 张凤英, 马春艳, 等. 条斑紫菜抗坏血酸过氧化物酶基因的 cDNA 克隆和序列分析 [J]. *中国水产科学*, 2005, 12(3): 281–287.
- [33] Gong Q, Han F, Dai J, *et al.* Rapid isolation and sequence analysis of the beta-tubulin gene from *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2005, 17.
- [34] Nikaido I, Asamizu E, Nakajima M, *et al.* Generation of 10,154 expressed sequence tags from a leafy gametophyte of a marine red alga, *Porphyra yezoensis* [J]. *DNA Res*, 2000, 7(3): 223–227.
- [35] Asamizu E, Nakajima M, Kitade Y, *et al.* Comparison of RNA expression profiles between the two generations of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta), based on expressed sequence tag frequency analysis [J]. *Journal of Phycology*, 2003, 39: 923–930.
- [36] 王孟强. 条斑紫菜功能基因组特性与抗逆相关基因表达分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007: 165–178.
- [37] Charron J F, Ouellet F, Pelletier M, *et al.* Identification, expression, and evolutionary analyses of plant lipocalins [J]. *Plant Physiology*, 2005, 139: 2017–2028.
- [38] Fuhrer T, Chen L, Sauer U, *et al.* Computational prediction and experimental verification of the gene encoding the NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup>-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase in *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(22): 8073–8078.
- [39] Zhao X Y, Gao S, Cui D L, *et al.* In silico cloning of *Efp-0*, a novel earthworm fibrinolytic enzyme gene, and verification of its coding region by RT-PCR [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, 22(6): 897–901.
- [40] Chen Y I, Zhao Y U, Wu R E. In silico cloning of mouse *Muc5b* gene and upregulation of its expression in mouse asthma model [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(6): 1059–1066.
- [41] Hirschhorn R, Huie M L, Kasper J S. Computer assisted cloning of human neutral alpha -glucosidase C (GANC): A new paralog in the glycosyl hydrolase gene family 31 [J]. *PNAS*, 2002, 99(21): 13642–13646.

## cDNA cloning and characterization of a novel ubiquitin-conjugating enzyme gene from *Porphyra yezoensis* Ueda

YI Le-fei<sup>1</sup>, LIU Chu-wu<sup>2</sup>, WANG Ping<sup>1</sup>, ZHOU Xiang-hong<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

**Abstract:** The ubiquitin-proteasome system (UPS) plays an important role in post-translational process, which is responsible for a diverse array of biologically important cellular processes. The UPS is also involved in the protein quality control, which maintains the health of the cell. Thus, the UPS provides a clue for understanding of the molecular mechanisms underlying various tolerances of organism to diversiform adverse conditions as well as stress combination. Ubiquitin-conjugating enzyme (*E2*) is a critical component of UPS. Cloning of ubiquitin-conjugating enzyme gene (*PyE2*) of *Porphyra yezoensis* Ueda will facilitate us to investigate tolerance of *P. yezoensis* to diversiform adverse conditions and degradation of enable protein by UPS. cDNA sequence (GenBank accession: FJ232910) of *PyE2* was isolated successfully through experiment of RT-PCR under direction of in silico cloning. This cDNA contained a 444 nt of complete open reading frame (ORF) coding a 16.6 ku protein (*PyE2*) of 147 amino acids sequence. *PyE2* had significant amino acid sequence identity and similarity with *E2*s from other organism, which indicated *E2* was highly conserved in the evolution. *PyE2* contained conserved sequence and cysteine residue of active site of *E2* family, and tertiary structure of *PyE2* was similar to human class I *E2*. *PyE2* was a class I member of *E2* family of *P. yezoensis* according to bioinformatics analysis.

**Key words:** *Porphyra yezoensis* Ueda; ubiquitin-conjugating enzyme (*E2*); cloning; bioinformatics