

## 三角帆蚌 $\beta$ -肌动蛋白基因的 cDNA 全长克隆及表达分析

袁一鸣<sup>1</sup>, 李家乐<sup>1,2\*</sup>, 汪桂玲<sup>1</sup>, 白志毅<sup>1</sup>, 李西雷<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海市高校水产养殖学 E 研究院, 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 采用 RT-PCR 和快速扩增 cDNA 末端 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技术首次克隆了三角帆蚌  $\beta$ -肌动蛋白基因的 cDNA 全序列, 该序列全长为 1 483 bp, 由长 92 bp 的 5' 非翻译区 (untranslated region, UTR), 257 bp 的 3' 非翻译区, 和 1 134 bp 的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 组成。阅读框共编码 377 个氨基酸, 推算的分子量约为 41.9 ku, 理论等电点为 5.3。三角帆蚌  $\beta$ -actin 氨基酸序列中 Met178, Ser305, Ser321, Pro325, Val331, Pro346 等 6 个氨基酸残基具有特异性, 此外还发现 3 个特殊的氨基酸残基位点以及 2 个软体动物特有的氨基酸残基。三角帆蚌  $\beta$ -actin 氨基酸序列与软体动物、节肢动物、脊椎动物的相似性高达 98%~99%。NJ 法系统进化分析显示三角帆蚌首先与软体动物聚在一起, 然后与节肢动物聚在一起, 再依次与鱼类、两栖类、哺乳类聚在一起。RT-PCR 显示  $\beta$ -actin 基因在外套膜、血液、肝、肾、胃、肠、鳃、斧足共 8 个组织的表达基本一致, 具有良好的稳定性。

**关键词:** 三角帆蚌; 快速扩增 cDNA 末端 (RACE);  $\beta$ -肌动蛋白基因; cDNA

**中图分类号:** Q 786; S 917

**文献标识码:** A

肌动蛋白 (actin) 在细胞中无处不在, 几乎参与了真核细胞的所有生理过程<sup>[1-3]</sup>, 如在肌肉细胞中的肌肉收缩, 在非肌肉细胞中的细胞骨架形成、细胞分裂、细胞运动, 以及移动、细胞吞噬功能、内吞作用和胞外分泌等<sup>[4-8]</sup>。从线虫到人类, 肌动蛋白在不同细胞中都有着数量高而稳定的表达<sup>[9]</sup>。刘秀霞等<sup>[10]</sup>的研究结果显示, 鱼类、两栖类、鸟类、哺乳类等不同类群脊椎动物  $\beta$ -actin 氨基酸序列同源性均在 96% 以上, 表明  $\beta$ -actin 基因的高度保守性。此外,  $\beta$ -actin 基因 mRNA 的表达几乎不随年龄增长而变化, 因此在研究某个基因 mRNA 的相对表达量时, 常采用  $\beta$ -actin 基因 mRNA 作为内标<sup>[11]</sup>。

三角帆蚌 (*Hypriopsis cumingii*) 是我国特有种, 是优良的淡水育珠母蚌, 三角帆蚌所产的珍珠质量佳, 珠质细腻、光滑、色泽鲜艳、形状较圆<sup>[12]</sup>。迄今为止, 有关三角帆蚌的  $\beta$ -actin 基因全序列尚未见报道。本研究成功克隆了三角帆蚌的  $\beta$ -actin

基因全长 cDNA 序列, 并检测了其在外套膜、血液、肝、肾、胃、肠、鳃、斧足等 8 个组织中的表达情况, 为进一步研究三角帆蚌  $\beta$ -actin 基因的结构和功能提供了理论依据, 同时也为三角帆蚌其他功能基因的研究提供可靠的分子内标。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**实验蚌** 三角帆蚌采自浙江省金华市威旺养殖新技术有限公司生产基地。

**试剂** RNAiso Plus、Primescript<sup>TM</sup> RT-PCR Kit、TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0、TaKaRa pMD19-T Vector 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; *E. coli* DH5 $\alpha$ 、TIANgel Midi Purification Kit 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit、Advantage<sup>®</sup> 2 PCR Enzyme System 购自 BD Biosciences Clontech 公司。

收稿日期: 2009-12-30 修回日期: 2010-01-17

资助项目: “九七三”计划前期研究专项项目 (2009CB126001); 国家自然科学基金项目 (30871923); 国家科技支撑项目 (2006BAD01A13); 上海市科委地方院校能力建设项目 (08390510100)

通讯作者: 李家乐, E-mail: jlli@shou.edu.cn

## 1.2 三角帆蚌 $\beta$ -actin 基因全长 cDNA 的克隆和序列测定

外套膜总 RNA 提取 按 RNAiso Plus 说明提取三角帆蚌外套膜、血液、肝、肾、胃、肠、鳃、斧足的总 RNA。

全长 cDNA 的克隆和序列测定 三角帆蚌外套膜 cDNA 文库源自本实验室。

3' 末端扩增使用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 试剂盒,用 Primer primer 5.0 设计上游特异性引物  $\beta$ f: 5'-TGTAGCCGCTT-TAGTTGTGG -3',下游引物为试剂盒中的 M13 Primer M4: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'。扩增 3' 端的 PCR 反应参数:94 °C 3 min;94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。

5' 末端扩增使用 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 与 Advantage<sup>®</sup> 2PCR Enzyme System 试剂盒,用 Primer primer 5.0 设计下游特异性引物  $\beta$ r: 5'-CATACATTGCTGGGCAGTTGA -3',上游引物为试剂盒中的 UPM: 5'-CTAA-TACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATC-AACGCAGAGT-3' (Long); 5'-CTAATACGACT-CACTATAGGGC-3' (Short)。扩增 5' 端的 PCR 反应参数:94 °C 3 min;94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 1 min, 25 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。

扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测,用 TIANgel Midi Purification Kit 回收目的片段 PCR 产物,连入克隆载体 pMD19-T,转化到感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,所获得的阳性克隆由上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。

## 1.3 三角帆蚌 $\beta$ -actin 基因序列与氨基酸序列的同源性分析及分子进化分析

将获得的三角帆蚌  $\beta$ -actin 基因的全长 cDNA 序列与 GenBank 核酸数据库及蛋白数据库作 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 分析。应用 ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 确定正确的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 并推导其编码的氨基酸序列。ProtParam 程序 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测氨基酸序列的物理参数,Scratch 程序 (<http://www.ics.uci.edu/~baldig/scratch/index.html>) 预测二

硫键, TMpred server ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) 分析跨膜结构, Signal P 3.0 server 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP>) 预测信号肽, PSORT II Prediction 程序 (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>) 基于其氨基酸序列预测蛋白质亚细胞定位点。BLASTp 于 GenBank 中进行相似性检索, ClustalX<sup>[13]</sup> 软件对相应的氨基酸序列进行分析。然后用 MEGA 4.0<sup>[14]</sup> 软件,采用邻位相接法 (NJ) 构建三角帆蚌  $\beta$ -actin 氨基酸序列与其他 14 种物种的  $\beta$ -actin 氨基酸序列的系统进化树,采用 Bootstrap 重复 1 000 次计算各分支的置信度。

## 1.4 三角帆蚌 $\beta$ -actin 基因在 8 个组织中的表达

用 Primer primer 5.0 跨内含子设计上游特异性引物  $\beta$ rf: 5'-GCCGTGTTCCATCCATCG -3', 下游特异性引物为  $\beta$ tr: 5'-CTGTTGGCTT-TAGGGTTGAG -3', 参照 Primescript<sup>™</sup> RT-PCR Kit 中 RT-PCR 体系,对外套膜组织的 RNA 进行 PCR 扩增,并对退火温度及循环次数进行优化,获得适宜的实验参数。建立稳定的扩增体系后,按 Primescript<sup>™</sup> RT-PCR Kit 试剂盒说明反转录外套膜、血液、肝、肾、胃、肠、鳃、斧足 8 个组织的总 RNA 后,进行半定量 PCR 检测。PCR 反应条件为:94 °C 3 min;94 °C 30 s, 64 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 血液总 RNA 及 RACE 产物的鉴定

对提取的外套膜总 RNA 进行电泳分析、OD 值检测。用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察,可见完整性(图 1-A)。用分光光度计测 OD 值,记录 R 值 ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) 为 1.87,结果表明提取的总 RNA 纯度高。提取的总 RNA 符合 RACE 扩增要求。对 3' RACE 及 5' RACE 的产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳(图 1, Marker 均为 D2000 DNA 分子量标准),所得产物分别约为 1 400 bp(图 1-B)和 500 bp(图 1-C)。

### 2.2 三角帆蚌 $\beta$ -actin 基因 cDNA 全长序列的特征

扩增测序得到三角帆蚌  $\beta$ -actin 基因的全长 cDNA 序列,推导获得其氨基酸序列。获得的 cDNA 序列全长 1 483 bp (GenBank 登录号:

HM045420),5'UTR 为 92 bp,3'UTR 为 257 bp。开放阅读框长度为 1 134 bp,可编码 377 个氨基酸。图 2 中 AATAAA 为推测的多聚腺苷酸加尾信号位点(Polyadenylation Signal Site)。

2.3 三角帆蚌  $\beta$ -actin 基因氨基酸的序列特征

推导得到的氨基酸共有 377 个,GC 含量为 49.03%,预测得到的氨基酸分子量大约为 41.9 ku,理论等电点为 5.3。甘氨酸(Gly)含量最高为 7.67%,色氨酸(Trp)含量最少为 1.06%(图 3)。带负电荷氨基酸残基(Asp + Glu)49 个,带正电荷氨基酸残基(Arg + Lys)37 个。脂肪族氨基酸指数为 80.72,原子总量 5 844,分子式为 C<sub>1856</sub>H<sub>2909</sub>N<sub>493</sub>O<sub>563</sub>S<sub>23</sub>。三角帆蚌  $\beta$ -actin 氨基酸含有 6 个半胱氨酸(Cys),形成 2 个二硫键,分别连接第 259 位和第 287 位,第 19 位和第 131 位的半胱氨

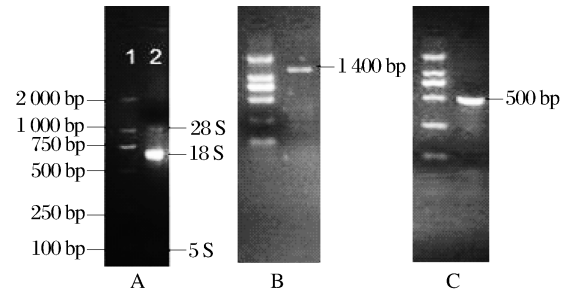


图 1 三角帆蚌总 RNA 完整性的检测以及 3',5' RACE 扩增产物电泳图

A:RNA 完整性检测;B:3'RACE 产物;C:5'RACE 产物;1:D2000 DNA 分子量标准;2:三角帆蚌总 RNA 提取产物。

Fig.1 Gel electrophoresis pattern of total RNA and 3',5' RACE product from H. cumingii

A: The gel electrophoresis pattern of total RNA; B:3'RACE product; C:5'RACE product. 1: D2000 DNA Maker; 2: Total RNA product of H. cumingii.

1 aagcagtggtatcaacgcagagtagcgggggttcctctcgcctccagctttcgtacggataac
67 acaaggaaaggaaacttaaggctcaata
93 ATGTCTGGGGAAGATGATGTAGCCGCTTTAGTTGTGGACAATGGATCCGGTATGTGCAAGGCC
M S G E D D V A A L V V D N G S G M C K A
156 GGTITTTGCTGGAGATGATGCACCAAGAGCCGTGTTCCATCCATCGTGGGAGACCCAGACAT
G F A G D D A P R A V F P S I V G R P R H
219 CAGGGTGTGATGGTTGGTATGGGACAGAAGGACAGCTATGTCCGAGACGAAGCCAGACCAAG
Q G V M V G M G Q K D S Y V G D E A Q S K
282 AGAGGTATCCTCACCCCTCAAGTATCCTATTGAACACGGAAATTTAACAACACTGGGATGATATG
R G I L T L K Y P I E H G I V T N W D D M
345 GAGAAGATCTGGCATCACACCTTCTACAATGAACTCCGTGTGGCCCTGAAGAACACCCCTGTT
E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V
408 CTGTTGACAGAAGCTCCCTCAACCCTAAAGCCAAACAGAGAAAAGATGACACAGATCATGTTT
L L T E A P L N P K A N R E K M T Q I M F
471 GAGACCTTCAACTGCCACGCAATGTATGTTGCGATTTCAGGCTGTGTTGTCGCTGTACGCTTCC
E T F N C P A M Y V A I Q A V L S L Y A S
534 GGTCTGACTACTGATTTGCTTAGACTCTGGTGTGGTGTGACTCACACCGTCCCCATCTAT
G R T T G I V L D S G D G V T H T V P I Y
597 GAAGTTACGCCCTTCTCATGCCATCATGCGTCTTGACTTGGCAGGTAGAGATCTGACAGAT
E G Y A L P H A I M R L D L A G R D L T D
660 TACCTCATGAAAATCCTCACAGAGCGTGGCTACTCCTTCACAACCCTGCGTGAAGAGAAAATC
Y L M K I L T E R G Y S F T T T A E R E I
723 GTCAGAGATATCAAGGAGAAAATGTGCTATGTAGCCCTCGACTTTGAGCAGGAAATGTCCACA
V R D I K E K L C Y V A L D F E Q E M S T
786 GCTGCTTCTAGTTCCTGGGAGAAGAGCTATGAACTTCCGACGGCCAGGTAATCACTATA
A A S S S S L E K S Y E L P D G Q V I T I
849 GGC AACGAGAGATTACAGTCCCCAGAGCCCTTGTTCAGCCTAGCTTCTTGGGAATGGAATCT
G N E R F R C P E A L F Q P S F L G M E S
912 GCAGGTATCCATGAGACAACCTACAACAGCATCATGAAAGTGTGATGTGACATCAGGAAAAGAC
A G I H E T T Y N S I M K C D V D I R K D
975 TTGTATGCTAACACTGTATTGTCTGGTGTTCACCATGTTCCCTGGAATCGCTGACCGTATG
L Y A N T V L S G G S T M F P G I A D R M
1038 CAGAAAAGAAATTACATCCCTAGCTCCTCAACCATGAAGATCAAGGTCATCGCTCCACCAGAG
Q K E I T S L A P P T M K I K V I A P P E
1101 AGGAAGTACTCCGTATGGATCGGTGGTCCCATTGCTTCTCTCCACCTTCCAGCAGATG
R K Y S W W I G G P I L A S L S T F Q Q M
1164 TGGATCAGCAAGCAGGAGTATGATGAATCAGGACCCAGCATTGTCACAGAAAAGTGCCTTCTGA
W I S K Q E Y D E S G P S I V H R K C F \*
1227 catttttttttaataactgaagatctgaaaactctgaactgtcaagaaatcttacaattacata
1290 tttcagaaaactgtttttataccattttattttttctgttatactgatgtaagtaattcct
1353 gataatggataagcaataaaaaaatattttgtatgcttttagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
1416 aataaaa
1479 aaaa 1483

图 2  $\beta$ -actin 编码基因 cDNA 全长及推导的氨基酸序列

小写字母代表 3',5'端非翻译区;大写字母部分为编码区,且上面为核苷酸序列,下面为氨基酸序列;方框标出的是多聚腺苷酸加尾信号位点 AATAAA; \* 表示终止密码子。

Fig.2 Full-length of cDNA and deduced amino acid sequence of  $\beta$ -actin from H. cumingii

3',5'untranslated regions are shown as lowercases; Coding region is shown as uppercases, where the upper sequence indicates the nucleotides and the lower shows the amino acids; Putative polyadenylation signals(AATAAA) are boxed; Stop codon is marked with asterisk( \* ).

酸(Cys)。有 2 个跨膜结构,分别为第 128 ~ 148 位和第 339 ~ 357 位(图 4)。信号肽预测结果显

示无信号肽,蛋白质亚细胞定位为细胞骨架(44%)。

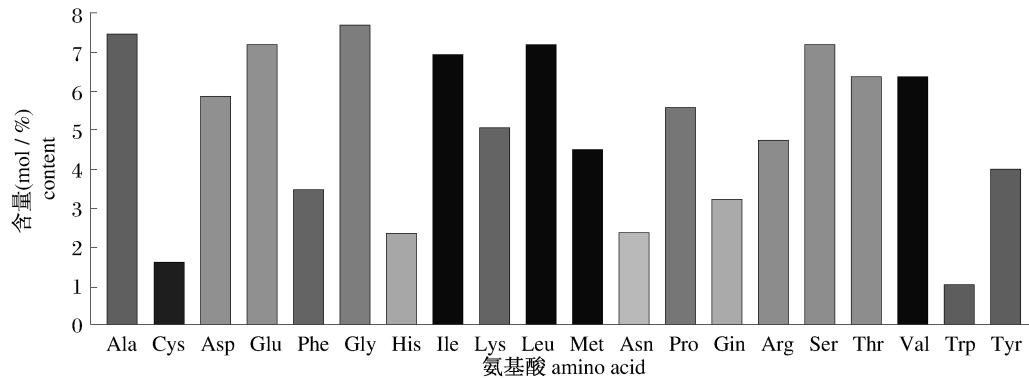


图 3 三角帆蚌  $\beta$ -actin 氨基酸组成表

Fig. 3 Amino acid composition of  $\beta$ -actin from *H. cumingii*

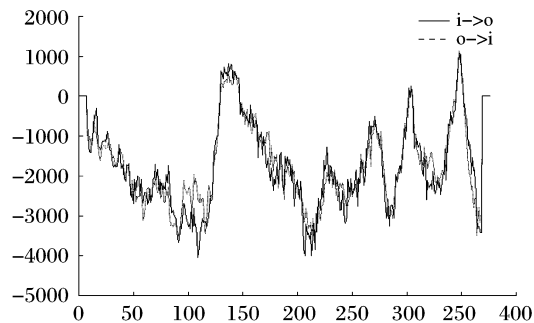


图 4 三角帆蚌  $\beta$ -actin 氨基酸跨膜结构图

Fig. 4 Transmembrane area predicted in  $\beta$ -actin from *H. cumingii*

用 Bioedit<sup>[15]</sup> 软件将三角帆蚌  $\beta$ -actin 氨基酸序列与其他 14 种动物的  $\beta$ -actin 氨基酸序列进行多序列比对结果见图 5。上述动物 N-末端保守序列 Ala-Leu-Val-Val-Asp-Asn-Gly-Ser-Gly 的上游和下游分别是 Ala 和 Met 残基,表示  $\beta$ -actin 基因与胞质肌动蛋白异性体有密切关系<sup>[4,16]</sup>。

基于  $\beta$ -actin 氨基酸序列采用 MEGA 4.0 软件以 NJ 法构建了 15 种动物的系统进化树(图 6),三角帆蚌与软体动物门的其他物种聚在一起,然后与节肢动物聚在一起,再依次与脊椎动物的鱼类、两栖类、哺乳类聚在一起。

<i>Mus musculus</i>	-M- <u>DDIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDE</u> 57
<i>Phascolarctos cinereus</i>	-M- <u>DDIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDE</u> 57
<i>Homo sapiens</i>	-M- <u>DDIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDE</u> 57
<i>Xenopus laevis</i>	-M- <u>EDDIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDE</u> 57
<i>Rana lessonae</i>	-M- <u>EDDIAALVVDNASGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDE</u> 57
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	-M- <u>EDEIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDE</u> 57
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	-M- <u>EDEIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDE</u> 57
<i>Platichthys flesus</i>	-M- <u>DDEIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDE</u> 57
<i>Ornithodoros moubata</i>	-MC- <u>DDEVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDE</u> 58
<i>Litopenaeus vannamei</i>	-MC- <u>DDEVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDE</u> 58
<i>Aedes albopictus</i>	-MW- <u>DDEVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDE</u> 58
<i>Crassostrea gigas</i>	-MG- <u>DEEVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDE</u> 58
<i>Mizuhopecten yessoensi</i>	-MC- <u>DDDVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDE</u> 58
<i>Pinctada fucata</i>	-MC- <u>DDEVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDE</u> 58
<i>Hypriopsis cumingii</i>	-MSGEDDVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDE 59
	* :***** .*****
<i>Mus musculus</i>	AQSKRGILTLKYP <sup>IEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANRE</sup> 117
<i>Phascolarctos cinereus</i>	AQSKRGILTLKYP <sup>IEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANRE</sup> 117
<i>Homo sapiens</i>	AQSKRGILTLKYP <sup>IEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANRE</sup> 117
<i>Xenopus laevis</i>	AQSKRGILTLKYP <sup>IEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANRE</sup> 117
<i>Rana lessonae</i>	AQSKRGILTLKYP <sup>IEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANRE</sup> 117

<i>Oncorhynchus mykiss</i>	AQSKRGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANRE	117
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	AQSKRGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANRE	117
<i>Platichthys flesus</i>	AQSKRGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANRE	117
<i>Ornithodoros moubata</i>	AQSKRGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANRE	118
<i>Litopenaeus vannamei</i>	AQSKRGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANRE	118
<i>Aedes albopictus</i>	AQSKRGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANRE	118
<i>Crassostrea gigas</i>	AQSKRGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANRE	118
<i>Mizuhopecten yessoensi</i>	AQSKRGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANRE	118
<i>Pinctada fucata</i>	AQSKRGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANRE	118
<i>Hypriopsis cumingii</i>	AQSKRGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANRE	119
	*****	
<i>Mus musculus</i>	KMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR	177
<i>Phascolarctos cinereus</i>	KMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR	177
<i>Homo sapiens</i>	KMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR	177
<i>Xenopus laevis</i>	KMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR	177
<i>Rana lessonae</i>	KMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR	177
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	KMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR	177
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	KMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR	177
<i>Platichthys flesus</i>	KMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR	177
<i>Ornithodoros moubata</i>	KMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIV $\square$ DSGDGV $\square$ HTVPIYEGYALPHAILR	178
<i>Litopenaeus vannamei</i>	KMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIV $\square$ DSGDGV $\square$ HTVPIYEGYALPHAILR	178
<i>Aedes albopictus</i>	KMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIV $\square$ DSGDGV $\square$ HTVPIYEGYALPHAILR	178
<i>Crassostrea gigas</i>	KMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIV $\square$ DSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR	178
<i>Mizuhopecten yessoensi</i>	KMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIV $\square$ DSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR	178
<i>Pinctada fucata</i>	KMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIV $\square$ DSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR	178
<i>Hypriopsis cumingii</i>	KMTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIV $\square$ DSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR	179
	*****	
<i>Mus musculus</i>	LDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAKREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLE	237
<i>Phascolarctos cinereus</i>	LDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLE	237
<i>Homo sapiens</i>	LDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLE	237
<i>Xenopus laevis</i>	LDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLE	237
<i>Rana lessonae</i>	LDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLE	237
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	LDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLE	237
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	LDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLE	237
<i>Platichthys flesus</i>	LDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLE	237
<i>Ornithodoros moubata</i>	LDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLE	238
<i>Litopenaeus vannamei</i>	LDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLE	238
<i>Aedes albopictus</i>	LDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLE	238
<i>Crassostrea gigas</i>	LDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLE	238
<i>Mizuhopecten yessoensi</i>	LDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLE	238
<i>Pinctada fucata</i>	LDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLE	238
<i>Hypriopsis cumingii</i>	LDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLE	239
	*****	
<i>Mus musculus</i>	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETT $\square$ NSIMKCDVDIRKDLYANT	297
<i>Phascolarctos cinereus</i>	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETT $\square$ NSIMKCDVDIRKDLYANT	297
<i>Homo sapiens</i>	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETT $\square$ NSIMKCDVDIRKDLYANT	297
<i>Xenopus laevis</i>	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETT $\square$ NSIMKCDVDIRKDLYANT	297
<i>Rana lessonae</i>	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETT $\square$ NSIMKCDVDIRKDLYANT	297
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETT $\square$ NSIMKCDVDIRKDLYANT	297
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETT $\square$ NSIMKCDVDIRKDLYANT	297
<i>Platichthys flesus</i>	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETT $\square$ NSIMKCDVDIRKDLYANT	297

<i>Ornithodoros moubata</i>	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANT	298
<i>Litopenaeus vannamei</i>	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANT	298
<i>Aedes albopictus</i>	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMEACGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANT	298
<i>Crassostrea gigas</i>	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMES <u>AG</u> GIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANT	298
<i>Mizuhopecten yessoensi</i>	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMES <u>AG</u> GIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANT	298
<i>Pinctada fucata</i>	KSYELPDGQVITIGNERFRAPEAMFQPSFLGMES <u>AG</u> GIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANT	298
<i>Hypriopsis cumingii</i>	KSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMES <u>AG</u> GIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANT	299
	*****:*:*****:*****:*****:*****	
<i>Mus musculus</i>	VLSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI	357
<i>Phascolarctos cinereus</i>	VLSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI	357
<i>Homo sapiens</i>	VLSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI	357
<i>Xenopus laevis</i>	VLSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI	357
<i>Rana lessonae</i>	VLSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI	357
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	VLSGGTTMYPGIADRMQKEITSLAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI	357
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	VLSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI	357
<i>Platichthys flesus</i>	VLSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI	357
<i>Ornithodoros moubata</i>	VLSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI	358
<i>Litopenaeus vannamei</i>	VLSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI	358
<i>Aedes albopictus</i>	VLSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI	358
<i>Crassostrea gigas</i>	VLSGGTTM <u>EP</u> GIADRMQKEITALAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI	358
<i>Mizuhopecten yessoensi</i>	VLSGGTTM <u>EP</u> GIADRMQKEITALAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI	358
<i>Pinctada fucata</i>	VLSGG <u>STM</u> <u>EP</u> GIADRMQKEITALAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWI	358
<i>Hypriopsis cumingii</i>	VLSGG <u>STM</u> <u>EP</u> GIADRMQKEIT <u>SL</u> AP <u>TM</u> KIKI <u>VI</u> IPPERKYSVWIGG <u>PL</u> ASLSTFQQMWI	359
	*****:*:*****:*****:*****:*****	
<i>Mus musculus</i>	SKQEYDESGPSIVHRKCF	375
<i>Phascolarctos cinereus</i>	SKQEYDESGPSIVHRKCF	375
<i>Homo sapiens</i>	SKQEYDESGPSIVHRKCF	375
<i>Xenopus laevis</i>	SKQEYDESGPSIVHRKCF	375
<i>Rana lessonae</i>	SKQEYDESGPSIVHRKCF	375
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	SKQEYDESGPSIVHRKCF	375
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	SKQEYDESGPSIVHRKCF	375
<i>Platichthys flesus</i>	SKQEYDESGPSIVHRKCF	375
<i>Ornithodoros moubata</i>	SKQEYDESGPSIVHRKCF	376
<i>Litopenaeus vannamei</i>	SKQEYDESGPSIVHRKCF	376
<i>Aedes albopictus</i>	SKQEYDESGPSIVHRKCF	376
<i>Crassostrea gigas</i>	SKQEYDESGPSIVHRKCF	376
<i>Mizuhopecten yessoensi</i>	SKQEYDESGPSIVHRKCF	376
<i>Pinctada fucata</i>	SKQEYDESGPSIVHRKCF	376
<i>Hypriopsis cumingii</i>	SKQEYDESGPSIVHRKCF	377
	*****	

图5 三角帆蚌与其他动物的  $\beta$ -actin 氨基酸的多序列比对结果

阴影部分表示三角帆蚌特有的氨基酸残基,方框表示各物种特有的氨基酸残基,保守序列用下划线表示。

*Mus musculus*:小家鼠(BAE30426.1);*Phascolarctos cinereus*:澳洲树袋熊(AAY53911.1);*Homo sapiens*:人(NP\_001092.1);*Xenopus laevis*:非洲爪蟾(NP\_001082422.1);*Rana lessonae*:莱桑池蛙(AAQ18432.1);*Oncorhynchus mykiss*:虹鳟(NP\_001117707.1);*Acanthopagrus schlegelii*:黑鲷(AAR84618.1);*Platichthys flesus*:川鲮(AAF63665.1);*Ornithodoros moubata*:毛白钝缘蜱(BAE46505.1);*Litopenaeus vannamei*:凡纳滨对虾(AAG16253.1);*Aedes albopictus*:白纹伊蚊(ABG46341.1);*Crassostrea gigas*:太平洋牡蛎(BAB84579.1);*Mizuhopecten yessoensis*:虾夷扇贝(ABG78596.1);*Pinctada fucata*:合浦珠母贝(ACD99707.1);*Hypriopsis cumingii*:三角帆蚌(HM045420)。

Fig. 5 Alignment of amino acid sequences of  $\beta$ -actin from *H. cumingii* and other species

The special amino acid residues of *H. cumingii* are shaded, the special amino acid residues of species are boxed, conserved sequences are underlined.

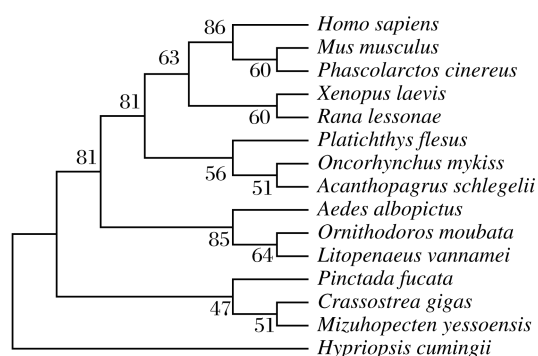


图 6 根据  $\beta$ -actin 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树  
*Homo sapiens*: 人 (NP\_001092.1); *Mus musculus*: 小家鼠 (BAE30426.1); *Phascolarctos cinereus*: 澳洲树袋熊 (AAY53911.1); *Xenopus laevis*: 非洲爪蟾 (NP\_001082422.1); *Rana lessonae*: 莱桑池蛙 (AAQ18432.1); *Platichthys flesus*: 川鲮 (AAF63665.1); *Oncorhynchus mykiss*: 虹鳟 (NP\_001117707.1); *Acanthopagrus schlegelii*: 黑鲷 (AAR84618.1); *Aedes albopictus*: 白纹伊蚊 (ABG46341.1); *Ormithodoros moubata*: 毛白钝缘蜱 (BAE46505.1); *Litopenaeus vannamei*: 凡纳滨对虾 (AAG16253.1); *Pinctada fucata*: 合浦珠母贝 (ACD99707.1); *Crassostrea gigas*: 太平洋牡蛎 (BAB84579.1); *Mizuhopecten yessoensis*: 虾夷扇贝 (ABG78596.1); *Hypriopsis cumingii*: 三角帆蚌 (HM045420)。

Fig. 6 NJ phylogenetic tree of  $\beta$ -actin of species

#### 2.4 三角帆蚌 $\beta$ -actin 基因的表达分析

经优化 PCR 条件,获得稳定的 PCR 反应体系后,RT-PCR 检测三角帆蚌  $\beta$ -actin 基因在外套膜、血液、肝、肾、胃、肠、鳃、斧足 8 个组织表达,电泳结果(图 7)显示  $\beta$ -actin 基因在 8 个组织中表达基本一致,具有良好的稳定性,表明适合作为内参基因。

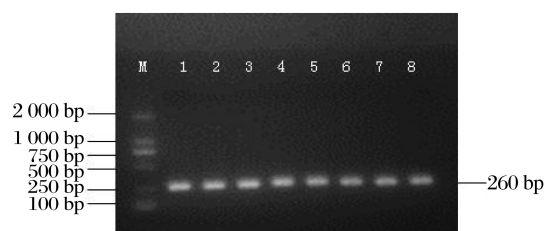


图 7 三角帆蚌各组织  $\beta$ -actin 基因的 RT-PCR 检测

M:Marker; 1:外套膜; 2:血液; 3:肝脏; 4:肾; 5:胃; 6:肠; 7:鳃; 8:斧足。

Fig. 7 Expression of  $\beta$ -actin mRNA in eight tissues from *H. cumingii* by RT-PCR

M:Marker; 1:mantle; 2:blood; 3:live; 4:kidney; 5:stomach; 6:gut; 7:gill; 8:abdominal foot.

### 3 讨论

本研究采用 RACE 技术,获得了三角帆蚌  $\beta$ -actin 基因的全长 cDNA 序列和开放阅读框,在淡水贝类中是首次报道。目前对软体动物  $\beta$ -actin 基因的研究主要集中在海水贝类<sup>[17]</sup>,国外如太平洋牡蛎<sup>[7,18]</sup>、大西洋深水扇贝<sup>[19]</sup> (*Placopecten magellanicus*)、欧洲笠螺<sup>[20]</sup> (*Patella vulgate*)、虹鲍<sup>[21]</sup> (*Haliotis iris*)等,国内有虾夷扇贝<sup>[22]</sup>、皱纹盘鲍<sup>[23-24]</sup> (*Haliotis discus hannai*)等。本次推导得到的三角帆蚌  $\beta$ -actin 氨基酸序列不但与太平洋牡蛎、虾夷扇贝、合浦珠母贝等软体动物具有很高的相似性,而且与凡纳滨对虾、虹鳟、黑鲷、川鲮等水产经济动物也有很高的相似性,与小鼠、人等高等脊椎动物的相似性也高达 98% ~ 99%,这符合  $\beta$ -actin 基因氨基酸编码区高度保守的特点<sup>[9,11]</sup>,可能与它参与构成细胞骨架等重要生理功能密切相关。

ClustalX 比对结果显示三角帆蚌  $\beta$ -actin 基因氨基酸序列与其他同源序列存在着一定差异,具体表现在 Met178, Ser305, Ser321, Pro325, Val331, Pro346 等 6 个氨基酸残基具有特异性。此外还发现几个特殊的氨基酸残基位点,如:第 154 位,软体动物和节肢动物是 Leu,而脊椎动物均为 Met。第 161 位,节肢动物为 Ser,其他物种均为 Thr。第 281 位,哺乳动物为 Phe,其他物种均为 Try。通过序列比对还发现了一些软体动物特有的氨基酸残基,如第 274 位,软体动物为 Ala,其他物种均为 Cys;第 308 位,软体动物为 Phe,其他物种均为 Try。大多数无脊椎动物  $\beta$ -actin 氨基酸序列以 Met-Cys 开始,后面跟着以 Glu 或 Asp 开头的氨基酸簇,而脊椎动物缺少 Cys<sup>[25]</sup>。三角帆蚌  $\beta$ -actin 氨基酸与几种海水贝类不同,以 Met-Ser-Gly 开头,后面跟着以 Glu 开头的氨基酸簇,因为还没有其他淡水贝类  $\beta$ -actin 基因的相关报道,所以有关三角帆蚌该基因氨基酸序列 N-末端的特殊性还有待于进一步研究。建树结果显示,三角帆蚌与软体动物门的其他物种聚在一起,然后与节肢动物聚在一起,再依次与脊椎动物的鱼类、两栖类、哺乳类聚在一起。三角帆蚌  $\beta$ -actin 基因的分子进化地位与三角帆蚌的生物学分类地位一致。

$\beta$ -actin 基因一直以来被作为内参基因广泛

应用于基因 mRNA 的相对表达实验。近年来有研究认为,  $\beta$ -actin 基因不适合作为内参基因<sup>[26-27]</sup>, 多种因素可影响该基因的表达: 氢化可的松、胰岛素、 $17\beta$ -雌二醇等生物刺激能够影响  $\beta$ -actin 基因的表达<sup>[28-29]</sup>; 在生物不同的生长阶段  $\beta$ -actin 基因的表达量有所不同<sup>[30]</sup>; 还有研究结果显示,  $\beta$ -actin 基因受某些疾病的影响表达量也有所不同<sup>[11,31]</sup>。本实验从半定量 PCR 得到的结果表明, 三角帆蚌  $\beta$ -actin 基因在外套膜、血液、肝、肾、胃、肠、鳃、斧足等 8 个组织中表达基本一致, 并具有良好的稳定性。鱼类以及无脊椎动物的分子生物学研究中,  $\beta$ -actin 基因仍是最常用的内参基因<sup>[32]</sup>, 如草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)<sup>[32]</sup>、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)<sup>[34]</sup>、皱纹盘鲍<sup>[23-24]</sup>等, 且表达稳定。另外, Wang 等<sup>[17]</sup>研究表明, 在合浦珠母贝中进行的实时定量 RT-PCR 检测中, 肌动蛋白在攻毒前后的合浦珠母贝血细胞中的表达无显著差异。对于今后三角帆蚌其他功能基因的相对表达研究, 只要通过在三角帆蚌表达实验中  $\beta$ -actin 基因是否受实验操作的影响的研究, 就可以判定该基因是否可以作为该实验的内参基因。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Welch M D, Holtzman D A, Drubin D G. The yeast actin cytoskeleton [ J ]. Cur Opin Cell Biol, 1994, 6 ( 1 ): 110 - 119.
- [ 2 ] Sheterline P, Sparrow J. Protein profile, actin [ M ]. London: Academic Press, 1994: 1 - 62.
- [ 3 ] Staiger C J, Schliwa M. Actin localization and function in higher plants [ J ]. Protoplasma, 1987, 141 ( 1 ): 1 - 12.
- [ 4 ] Pollard T D, Cooper J A. Actin and actin binding proteins: A critical evaluation of mechanisms and functions [ J ]. Annu Rev Biochem, 1986, 55: 987 - 1 035.
- [ 5 ] Rubenstein P A. The functional importance of multiple actin isoforms [ J ]. Bio Essays, 1990, 12 ( 7 ): 309 - 315.
- [ 6 ] Kabsch W, Vandekerckhove J. Structure and function of actin [ J ]. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1992, 21: 49 - 76.
- [ 7 ] Cadoret J P, Debon R, Cornudella L, et al. Transient expression assays with the proximal promoter of a newly characterized action gene from the oyster *Crassostrea gigas* [ J ]. FEBS Lett, 1999, 460: 81 - 85.
- [ 8 ] Valentijn K, Valentijn J A, Jamieson J D. Role of actin in regulated exocytosis and compensatory membrane retrieval: insights from an old acquaintance [ J ]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 266(3): 652 - 661.
- [ 9 ] Ma H M, Mai K S, LiuFu Z G. Cloning and characterization of an actin gene of *Chlamys farreri* and the phylogenetic analysis of mollusk actins [ J ]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2007, 25(3): 304 - 309.
- [ 10 ] 刘秀霞, 梁旭方, 王琳, 等. 鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*)  $\beta$ -肌动蛋白基因 cDNA 全序列与 5'侧翼区的克隆与分析 [ J ]. 海洋与湖沼, 2009, 40(1): 102 - 108.
- [ 11 ] Zhong H, Jonathan W S. Direct Comparison of GAPDH,  $\beta$ -actin, Cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia [ J ]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 259(3): 523 - 526.
- [ 12 ] Li J L, Li Y S. Aquaculture in China-Freshwater pearl culture [ J ]. World Aquaculture, 2009, 40(1): 60 - 62.
- [ 13 ] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [ J ]. Nucleic Acids Research, 1997, 25: 4876 - 4882.
- [ 14 ] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0 [ J ]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24: 1596 - 1599.
- [ 15 ] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [ J ]. Nucl Acids Symp Ser, 1999, 41: 95 - 98.
- [ 16 ] Rubenstein P A. The functional importance of multiple actin isoforms [ J ]. Bio Essays, 1990, 12 ( 7 ): 309 - 315.
- [ 17 ] Wang Z L, Wu Z H, Jian J C, et al. Cloning and expression of an actin gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850) [ J ]. Marine Genomics, 2008, 1: 63 - 67.
- [ 18 ] Miyamoto H, Hamaguchi M, Okosh K. Analysis of genes expressed in the mantle of oyster *Crassostrea gigas* [ J ]. Fish Sci, 2002, 68(3): 651 - 658.
- [ 19 ] Patwary M U, Reith M, Enchington L K. Isolation and characterization of cDNA encoding an actin gene from the sea scallop (*Placopecten maggelanicus*) [ J ]. Journal of Shellfish Research, 1996,



- 15:265-279.
- [20] Van Loon A E, Goedemans H J, Daeme A J J M, *et al.* Actin genes expressed during early development of *Patella Vulgate* [ J ]. Roux's Archives of Developmental Biology, 1993, 202: 77-84.
- [21] Maxine J, Heather J F, Frank Y T. Isolation, characterization and expression analysis of three actin genes in the New Zealand black-footed abalone, *Haliotis iris* [ J ]. Marine Biotechnology, 2006, 8(2): 110-119.
- [22] 刘卫东, 赫崇波, 刘彤, 等. 虾夷扇贝肌动蛋白基因 cDNA 序列克隆与分析 [ J ]. 水产科学, 2008, 27(10): 519-522.
- [23] 张志峰, 茅云翔, 潘洁, 等. 皱纹盘鲍肌动蛋白基因启动子的克隆和序列分析 [ J ]. 水产学报, 2001, 25(5): 398-401.
- [24] Ma H M, Xu W, Mai K S, *et al.* Cloning and characterization of an abalone (*Haliotis discus hannai*) actin gene [ J ]. Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research), 2004, 3(2): 145-149.
- [25] Kusakabe T, Araki I, Satoh N, *et al.* Evolution of chordate actin genes: evidence from genomic organization and amino acid sequences [ J ]. Mol Evol, 1997, 44: 289-298.
- [26] Ruan W J, Lai M D. Actin, a reliable marker of internal control [ J ]. Clinica Chimica Acta, doi: 10.1016/j.cca.2007.07.003.
- [27] Selvey S, Thompson E W, Matthaei K, *et al.*  $\beta$ -actin- an unsuitable internal control for RT-PCR [ J ]. Molecular and Cellular Probes, 2001, 15(5): 307-311.
- [28] Gorzelniak K, Janke J, Engeli S, *et al.* Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes [ J ]. Horm Metab Res, 2001, 33(10): 625-627.
- [29] Verma A S, Shapiro B H. Sex-dependent expression of seven housekeeping genes in rat liver [ J ]. Gastroenterology and Hepatology, 2006, 21: 1004-1008.
- [30] Moshier J A, Cornell T, Majumdar A P. Expression of protease genes in the gastric mucosa during aging [ J ]. Exp Gerontol, 1993, 28(3): 249-258.
- [31] Glare E M, Divjak M, Bailey M J, *et al.* Beta-actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalizing mRNA levels [ J ]. Thorax, 2002, 57(1): 765-770.
- [32] Gutala R V, Reddy P H. The use of real-time PCR analysis in a gene expression study of Alzheimer's disease post-mortem brains [ J ]. Neurosci Methods, 2004, 132(1): 101-107.
- [33] 王欣欣, 孙宝剑, 昌鸣先, 等. 草鱼免疫球蛋白 M 重链基因的克隆及表达 [ J ]. 水产学报, 2008, 32(1): 13-20.
- [34] 胥炜, 王昊, 宋林生, 等. 栉孔扇贝 C 型凝集素基因的克隆与表达研究 [ J ]. 高技术通讯, 2005, 15(1): 83-88.

## Cloning and expression analysis of $\beta$ -actin gene from *Hypriopsis cumingii*

YUAN Yi-ming<sup>1</sup>, LI Jia-le<sup>1,2\*</sup>, WANG Gui-ling<sup>1</sup>, BAI Zhi-yi<sup>1</sup>, LI Xi-lei<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University,

Ministry of Education, Shanghai 201306, China;

2. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, College of Fisheries and Life Science,

Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** A 1 438 bp full-length cDNA sequence of  $\beta$ -actin gene from *Hypriopsis cumingii* was obtained with RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique. It consists of a 92 bp 5' untranslated region (UTR), a 1 134 bp open reading frame (ORF) and a 257 bp 3' UTR. The translated protein is composed of 377 amino acids, with 41.9 ku molecular weight, and its calculated isoelectric point was 5.3. The amino acid sequence of  $\beta$ -actin in *H. cumingii* has six specific amino acid residues: Met178, Ser305, Ser321, Pro325, Val331 and Pro346, respectively. In addition, three other particular base sites of amino acid residues were found in these sequences. Similarly, two characteristic amino acid residues of some mollusks were obtained. The amino acids sequence of  $\beta$ -actin in *H. cumingii* shared the high similarity with Molluscs, Arthropod and Vertebrate animals (98% - 99%). Neighbor-Joining (NJ) tree suggested that *H. cumingii* clustered with Mollusca firstly, and then clustered with Arthropoda, finally clustered with Fish, Amphibians, Mammals. Semi-quantitative RT-PCR analyses showed that the expression level of  $\beta$ -actin gene in *H. cumingii* was stable in eight tissues: mantle, blood, liver, kidney, stomach, gut, gill and abdominal foot.

**Key words:** *Hypriopsis cumingii*; rapid amplification of cDNA ends (RACE);  $\beta$ -actin gene; cDNA

**Corresponding author:** LI Jia-le. E-mail: jlli@shou.edu.cn