

鲤胸腺素 T β 全长 cDNA 的克隆与序列分析

丰培金^{1,2}, 王文东¹, 李伟¹, 何江帅¹, 张俊辉¹, 杨振国¹, 卢强^{1*}

(1. 吉林大学人兽共患病研究所, 吉林 长春 130062;

2. 临沂师范学院生命科学学院, 山东 临沂 276005)

摘要: 应用荧光 DDRT-PCR 从鲤外周血白细胞克隆了鲤胸腺素 β (thymosin β , T β) 基因 cDNA 全序列。序列分析表明, T β cDNA 全长 528 bp, 其完整的读码框架位于 40 ~ 178 bp, 编码 46 个氨基酸, 5' 非编码区长 39 bp, 3' 非编码区长为 348 bp, 且具有 Poly(A) 加尾信号 (AATAAA), 将该基因序列递呈 GenBank, 注册序列号为 AY457946。氨基酸序列同源性分析显示, 鲤 T β 氨基酸序列与鲤 T β a、斑马鱼 T β a 及斑马鱼 T β -2 同源性均为 84%。在系统发生树上, 鲤 T β 与鲤、斑马鱼、白斑狗鱼和鲑 T β a 及斑马鱼 T β 2 聚类。

关键词: 鲤; 荧光 mRNA 差异显示; 白细胞; 胸腺素 β

中图分类号: Q 785; S 917

文献标识码: A

胸腺素 (Thymosins, T) 主要是由胸腺产生的一种淋巴生长因子, 普遍存在于各种组织细胞当中。1966 年 Goldstein 等^[1] 最早报告从小牛胸腺中提取出了具有生物活性的激素样物质, 称之为胸腺素。将等电点 (pI) 位于 5.0 ~ 7.0 的一组分子统称 β 族胸腺素 (T β), 其结构高度保守, 由 30 ~ 44 个氨基酸组成, 相对分子量约为 5 000, 广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物中。至今, 已发现 T β 有 15 种, 人体内存在 3 种 T β , 即 T β 4、T β 10 和 T β 15^[2], 它们在维持肌动蛋白的动态平衡^[3-4] 以及肿瘤发病与转移^[5-6]、细胞凋亡^[7]、炎症^[8]、血管生成^[9] 和创伤愈合^[8] 等很多生理、病理过程中发挥重要作用。

针对鱼类的 T β 研究较少, 已发现的鱼类 T β 有石纹电鳐 (*Torpedo marmorata*) 的 T β 10、鲤 (*Cyprinus carpio* L.) T β -a 与 T β -b、斑马鱼 (*Danio rerio*) T β ^[10]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) T β 11 与 T β 12^[11]、日本黑鲈 (*Lateolabrax japonicus*) T β 12^[12] 及长臀泥鳅虎鱼 (*Gillichthys mirabilis*) T β ^[13]。目前, 大多数的研究还仅孤立地研究某个 T β 亚型的功能, 对其生物功能间的关系及其差异性研究较少; T β 基因表达的研究大

部分局限于 mRNA 水平, 蛋白质水平的研究较少。相信随着结构、功能基因组学以及蛋白质组学的进一步发展, T β 各方面的作用机制将会在分子水平上得到进一步阐明。

1 材料与方法

1.1 试剂、试剂盒

LPS、PHA-P、Con-A 为 Sigma 公司产品, L2654、L9132、C0412, 肝素钠为 Sigma 公司产品, RPMI1640 培养液为 GIBCO BRL 公司产品, TRIZOL Reagent 为 Invitrogen 公司产品, HIEROGLYPHTM mRNA Profile System Kit 和 Fluoro DDRT-PCR Kit 均为 Beckman 公司提供, DNA 清洁试剂盒购自 Vitagene 公司, T₄ 连接酶购自 Promega 公司, Taq 酶购自 Gibco 公司, 各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司。

1.2 鲤外周血白细胞的分离

选择健康、体表鳞片完整且无脱落、体重 500 ~ 750 g 的鲤, 在水温 25 °C 的水族箱内充气饲养, 水体积为 200 L, 按正常饲养条件进行饲养。观察 7 d, 证实无病后, 从尾动脉采取外周血, 加肝素抗凝, 用等体积的鲤白细胞 RPMI1640 培养液

收稿日期: 2010-07-27 修回日期: 2010-09-11

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30972277)

通讯作者: 卢强, Tel: 0431-87836717, E-mail: qlu@jlu.edu.cn

(cRPMI1640)^[14]稀释,鲤外周血白细胞的分离操作见参考文献[14,15]。

1.3 外周血白细胞的分组与体外培养

计数后的白细胞用cRPMI 1640培养液重悬,密度调整为 $1.0 \times 10^7/\text{mL}$,分成8个组置于细胞培养瓶中进行试验,分组如下:对照组I、III、V和VII分别为正常白细胞,不加任何刺激物体外分别培养4、12、4和24 h;实验组II和IV为用LPS(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + PHA(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)分别刺激4和12 h;实验组VI和VIII加入ConA(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)分别刺激4 h和24 h。将各组的细胞培养瓶置于25 $^\circ\text{C}$ 、5%的 CO_2 培养箱内,按规定的时间培养,进行细胞计数和活细胞百分率计算。

1.4 外周血白细胞总RNA提取

采用试剂盒提取上述实验中I~VIII组鲤外周血白细胞总RNA,所用白细胞数量为 1×10^8 ,具体方法按TRIZOL Reagent说明书操作。用无RNase的DNase I处理总RNA,以消化基因组DNA。用1%琼脂糖凝胶检测RNA的质量,分光光度计测量RNA浓度。

1.5 样品总RNA的逆转录反应

采用HIEROGLYPHTM mRNA Profile System Kit,用于反转录的为 T_7 (dT_{12})锚定引物(Anchored Primers, AP),即 $T_{12}MN$ ($M = A/C/G$, $N = A/G/C/T$),共12条引物,其序列及操作按试剂盒说明书进行。

1.6 荧光(Fluoro)DDRT-PCR反应

采用Fluoro DDRT-PCR Kit,以 M_{13r} -ARP为5'端随机引物,以TMR- T_7 (dT_{12})AP为3'端锚定引物[荧光标记引物,序列同反转录 T_7 (dT_{12})AP引物]。

反应体系10.0 μL : ddH₂O 0.7 μL , 10 \times PCR Buffer II (with out MgCl_2) 1.0 μL , MgCl_2 (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.75 μL , dNTP (250 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 2.0 μL , TMP- T_7 (dT_{12}) AP (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.7 μL , ARP (2 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1.75 μL , Taq DNA polymerase (5 U/ μL) 0.1 μL , RT-mix 3.0 μL 。反应条件:95 $^\circ\text{C}$, 2 min; 94 $^\circ\text{C}$, 15 s; 50 $^\circ\text{C}$, 30 s; 70 $^\circ\text{C}$, 2 min; 4 cycles; 94 $^\circ\text{C}$, 15 s; 60 $^\circ\text{C}$, 30 s; 72 $^\circ\text{C}$, 1 min; 25 cycles; 72 $^\circ\text{C}$, 7 min; 4 $^\circ\text{C}$ 保温。

1.7 DDRT-PCR产物变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、荧光扫描及其分离

采用Genomyx LRS荧光差异显示分析系统

(Beckman,含Genomyx LR电泳仪,33 \times 61 cm凝胶板,Genomyx SC扫描系统,切胶工作台及定位刻度仪),按照操作说明进行。电泳条件:5.6%的变性HR-1000胶在电压3 000 V、功率100 W和55 $^\circ\text{C}$ 电泳4.5 h。将分离的胶溶于30 μL TE (pH 8.0)中,37 $^\circ\text{C}$ 孵育3 h,备用。

1.8 差异条带再扩增

以上述回收差异条带溶液为模板,利用通用引物 T_7 启动子22-mer和反 $M_{13(-48)}$ 24-mer,进行再扩增反应,反应体系40 μL : ddH₂O 18.5 μL , 10 \times PCR Buffer II (with MgCl_2) 4.0 μL , dNTP (250 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 6.0 μL , T_7 (10 $\text{pmol}/\mu\text{L}$) 3.0 μL , M_{13r} (10 $\text{pmol}/\mu\text{L}$) 3.0 μL , Taq DNA polymerase (2 Units/ μL) 1.0 μL , 模板4.5 μL 。反应条件同“1.6”。取PCR反应产物5 μL , 1.0%琼脂糖电泳观察扩增结果。

1.9 差异显示片段的纯化与克隆

采用Vitagene公司提供的DNA清洁试剂盒进行差异条带PCR扩增产物纯化操作,按说明书进行;纯化后用pMD 18-T载体按照试剂盒说明进行连接反应;取连接产物10 μL 加入到100 μL 的DH5 α 感受态细胞中,42 $^\circ\text{C}$ 热激活90 s,涂布于LB琼脂平板上(含氨苄青霉素50 $\mu\text{g}/\text{mL}$),于37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中倒置培养12~16 h,观察菌落生长情况。

1.10 重组质粒的PCR鉴定

将单个白色菌落接种至相应编号、含5 mL LB液体培养基(含氨苄青霉素50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的试管中,于37 $^\circ\text{C}$ 剧烈振荡培养过夜。采用 T_7 和 M_{13r} 引物鉴定阳性克隆,PCR反应体系(10 μL) 10 \times PCR Buffer 1.0 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μL , T_7 (10 $\text{pmol}/\mu\text{L}$) 0.7 μL , M_{13r} (10 $\text{pmol}/\mu\text{L}$) 0.7 μL , Taq Polymerase (2 Units/ μL) 0.3 μL , 菌液0.5 μL , ddH₂O 4.8 μL 。反应参数:(I) 95 $^\circ\text{C}$ 2 min;(II) 5 cycles: 92 $^\circ\text{C}$ 15 s, 50 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 2 min;(III) 27 cycles: 92 $^\circ\text{C}$ 15 s, 60 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 2 min;(IV) 72 $^\circ\text{C}$ 10 min;(V) 4 $^\circ\text{C}$ Hold。

1.11 阳性克隆片段的核苷酸序列测定及同源性分析

将鉴定后的阳性重组质粒测序并利用DNAtools软件包进行序列分析;运用ClustalW软件将推测的鲤T β 氨基酸序列与其它物种T β 进行多序列比对;使用MEGA 4.0软件,通过邻位相连法(Neighbour-Joining, NJ)对12种硬骨

鱼的 22 个 T β 分子进行进化树聚类分析,另外以人、小鼠、负鼠、赤鹿、褐家鼠 T β 4 氨基酸序列为外群,空位信息视为碱基缺失,自展检验设为 1 000 次。

2 结果

2.1 总 RNA 完整性的检测

紫外分光光度计检测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8 ~ 2,表明各组所提取的 RNA 质量较好。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,可以观察到两条典型的 18S 和 28S 条带,说明所提取的 RNA 完整性良好,可以用于进一步的差异显示分析。

2.2 差异片段的获得

以 12 条锚定引物 T₇(dT₁₂) - AP,即 T₁₂MN (M = A/C/G, N = A/G/C/T) 和 10 条随机引物 M₁₃r-ARP,对上述两个样品 RNA 进行 120 种引物组合的差异显示分析,部分差异显示电泳图谱如图 1。

2.3 差异片段测序、生物信息学分析

C34 克隆全长 cDNA 和序列分析 将鉴定后的阳性重组质粒测序,经 BLAST、DNAtools 软件包分析后,合并同源片段,结合差异显示电泳图谱,获得 1 个免疫应答相关基因的 cDNA 全长序列,其克隆编号为 C34。

```

1   GTG TAC TAC AGT CCC GAG GAC AGC GCC AGA CTC TCC AAA ATG AGC GAC AAC CCT GTA AAA   60
1   M S D N P V K ?
61   GAA GAA GTG CAG AAG TTT GAC AAG AGA TGT CTA AAG AAG ACG AAC ACG GCG GAG AAG AAC   120
8   E E V Q K F D E R C L K K T N T A E K N   27
121  ACT CTG CCC ACC AAA GAA GAT ATC GAG GAG GAG AAG AAG GCT GGA GAC GCG GCC AAA TGA   180
28  T L P T K E D I E E E K A G D G A K *   46
181  ATG TAA CCG GTG CCG GCT CTC CTC ACA TCC TCA CAC CTC CCG GAC GTC TAC TCC ACT GCT   240
241  GCG TAC ACC AAA TCA TTC TTC AGT CTA CTG GCA TTC ATA AAA CGA TGT GTA CCG CAG AAT   300
301  CAT GTG TGT AAT TGG AAG TGT GGA TAT TCT CGA TCT TTT TCA CCG TGT GCG ATT TAG AGA   360
361  GGA GAT GGA TGA TGA TGA TGA GCA CAG TTC TGT GTC TGT CAT GAA TAG CTA ACG GCT GCC   420
421  CAC ATC AAT CTG CTG CCA TCT GCG CTG GGT ATT CTC TAA GTA ACA TGT GAG ATG ATA TTT   480
481  TGA TTT ATA AAT GAT AAT AAA AAC TTT TAA AAT CCG AAA AAA AAA AAA   528

```

图 2 C34 基因的全长 cDNA 序列及推测的氨基酸序列

方框表示 poly(A) 加尾信号。

Fig. 2 Total length cDNA sequence of C34 gene and its deduced amino acid sequence

Box indicates the putative signal of poly(A) tail.

C34 分子理化性质、功能结构域及同源性分析 ExPASy Proteomics Server 中的 ProtParam 分析显示,C34 推测的蛋白分子量为 5.2 ku,等电

C34 cDNA 序列长 528 bp,其完整的读码框架位于 40 ~ 178 bp,编码 46 个氨基酸,5'UTR 为 39 bp,3'UTR 为 348 bp,且具有 Poly(A) 加尾信号(AATAAA),将其递交 GenBank,获得注册号为 AY457946。推测的 C34 的全长 cDNA 序列和氨基酸序列如图 2。

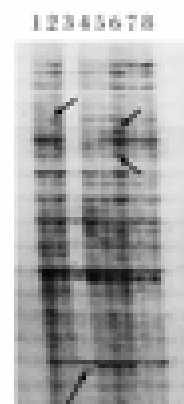


图 1 荧光 mRNA 差异显示电泳结果

1、3、5 和 7 为对照组 I、III、VI 和 VII 产物; 2、4、6 和 8 为刺激组 II、IV、VI 和 VIII 产物。

Fig. 1 The results of fluorescent mRNA differential display electrophoresis

1, 3, 5 and 7 indicate total RNA isolated from control leucocytes; 2, 4, 6 and 8 indicate total RNA isolated from stimulated leucocytes.

点为 6.22。ProtScale 中的 Hphob./Kyte & Doolittle 显示其疏水性氨基酸有 Ala、Cys、Ile、Leu、Met、Phe 和 Val,共 11 个,占总数的 23.9% ;

亲水性氨基酸有 Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Lys 和 Tyr, 共 28 个, 占总数的 60.8%。ScanProsite 发现在 18~29 存在 THYMOSIN_B4 (Thymosin beta-4 family signature) 基序。经 BLASTn 同源性搜索, 发现 C34 核苷酸序列 1~181 与鲤胸腺素 β a mRNA (dbj|AB028456.1) 的 3~183 核苷酸序列同源性为 93%; BLASTp 分析显示 C34 编码的氨基酸序列 (gb|AAS10353.1) 与鲤 (dbj|BAA96492.1) 和斑马鱼 T β a (dbj|BAH97321.1) 及斑马鱼 T β -2 (gb|ABJ53252.1) 同源性最高达 84%。

不同物种 β -胸腺素氨基酸序列的聚类分析根据鲤胸腺素氨基酸全序列和 DDBJ/

EMBL/GeneBank 数据库中的其它动物 β -胸腺素, 利用 ClustalW 软件进行多序列比对分析 (图 3), 构建的系统发生树见图 4, 在比较的 17 个物种 27 个 T β 氨基酸序列中, 鲤 C34 (gb|AAS10353.1) 与鲤、斑马鱼、白斑狗鱼 (*Esox lucius*) 和鲑 (*Salmo salar*) T β a 亲缘关系最近, 其次是与文昌鱼 T β -4、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 与大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) T β 、斑马鱼与鲤 T β b 的亲缘关系较近, 与鲈和鲑的 T β -12、虹鳟、白斑狗鱼与斑马鱼的 T β -11、胡瓜鱼的 T β -4 的距离较远。参与构建进化树的鲤及其他动物 β -胸腺素的情况说明见表 1。



图3 鲤鱼与其它动物胸腺素的同源氨基酸序列比较

Fig. 3 Multiple alignments of the carp thymosin beta amino acid sequences with other known thymosin proteins

· 续表 1 ·

编号 number	检索号 accession	T β 家族成员 member of β -thymosin	生物体 organism
185133516	gi 185133516 ref NP_001117822.1	beta thymosin	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
103915	gi 103915 pir S21282	thymosin beta-11	<i>Rainbow trout</i>
225715888	gi 225715888 gb ACO13790.1	Thymosin beta-11	<i>Esox lucius</i>
260064041	gi 260064041 ref NP_001159390.1	beta thymosin-like protein 2	<i>Danio rerio</i>
BAH97321	dbj BAH97321.1	thymosin beta-a	<i>Danio rerio</i>
ACO13749	gb ACO13749.1	Thymosin beta-a	<i>Esox lucius</i>
ACM09359	gb ACM09359.1	Thymosin beta-a	<i>Salmo salar</i>
BAA96492	dbj BAA96492.1	thymosin beta a	<i>Cyprinus carpio</i>
AAS10353	gb AAS10353.1	thymosin beta a	<i>Cyprinus carpio</i>

3 讨论

荧光标记的 mRNA 差异显示技术是 Ito 等^[16]于 1994 年首次报道,它主要是基于荧光素用于测序的原理,对原有的 DDRT-PCR 技术加以改进而建立的一种快速、安全、可靠、敏感并且能同时分析大量样本的 mRNA 差异显示方法^[17-18]。利用荧光 DDRT-PCR 技术通常可获得差异表达基因片段,本研究却获得鲤 T β 基因全长 cDNA 序列,其原因在于该基因序列较短仅 528 bp。

胸腺素是涉及胸腺 T 淋巴细胞分化、起源的几种相关多肽激素。根据等电点的不同,各种 T 组份可分为 α ($pI < 5$)、 β ($pI = 5 \sim 7$) 和 γ ($pI > 7$) 三组,用制备性反相高效液相色谱分离出 60 多种。而 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 等则是按在各组中被分离的次序编号。目前, β 族胸腺素越来越引起人们的关注。尽管其分子水平作用机制尚未阐明,但 T β 却与肌动蛋白的动态平衡、肿瘤发病与转移、炎症反应、细胞凋亡、血管生成及创伤愈合等人类的许多生理与病理过程关系密切。

本研究发现 C34 克隆编码鲤的 T β 的基因,与报道的鲤 T βa 氨基酸序列 (dbj | BAA96492.1 |) 的同源性为 84%,二者均由 46 个氨基酸构成,存在 7 处氨基酸替换,即后者 12、16、36、37、42、43 和 45 位置的氨基酸 Gly、Lys、Asp、Gln、Ala、Glu 和 Gly 分别被替换为 Lys、Arg、Glu、Glu、Gly、Asp 和 Ala。Erickson-Viitanen 等^[19]从鳟鱼肝分离到 T β -11,它是含 41 个氨基酸的肽,为胸腺素 β 家族成员,序列分析表明它同 T β -4 有 78% 的同源性。而 Yialouris^[11]等从鳟鱼脾分离到胸腺素 β 的两种全长序列形式 T β -11 和 T β -12,这两类胸腺素 β 的 N-末段均被乙酰基阻断,T β -11 由 41 个氨基酸构成,而 T β -12 是由 42 个氨基酸构成的肽,其序列非

常接近 T β -11,仅存在 5 处氨基酸替换;将已报道的 6 个胸腺素 β 序列进行比较,发现鳟鱼的这两个胸腺素 β 序列的类似性为 86%,远大于哺乳类的这两种胸腺素的类似性(74%),所有的胸腺素 β 在 28 位置的氨基酸残基均相同,较长的保守片段位于 16 ~ 26 和 31 ~ 38。Low 等^[12]从河鲈 (*Perca fluviatilis*) 肝中分离到一种新的肽—T β -12,它含 43 个氨基酸残基,分子量为 4.8 ku;序列分析揭示 T β -12 同 T β -4 有 79% 的同源性,它同 T β -11 (一种 T β -4 类似物,在两种硬骨鱼 Oscar 和虹鳟取代 T β -4) 有 84% 的同源性;这种新的 T β -4 相关肽的分离提示胸腺素 β 广泛分布于低等脊椎动物。Anathy 等^[20]发现,用 GnRH 类似物和 17- β 雌二醇处理 Paradise fish,从其卵巢的 cDNA 文库获得了一个与胸腺素 β 的 cDNA 相当的 EST (expressed sequence tags),它长 368 bp,编码 42 个氨基酸构成的肽,其推断的氨基酸序列同其它鱼类和哺乳动物的胸腺素 β 具有 61% 和 56% 的类似性。

将 C34 克隆编码的核苷酸序列及推断的氨基酸序列进行同源性分析,发现 C34 克隆无论核苷酸序列还是氨基酸序列与鲤胸腺素 βa 同源性最高;经系统进化树分析,鲤 C34 克隆氨基酸序列与鲤、斑马鱼、白斑狗鱼及鲑 T βa 亲缘关系最近,故所克隆的胸腺素 β 为鲤 T βa ,属于 T $\beta 4$ 家族成员。在大多数哺乳动物中,T $\beta 4$ 是 T β 的主要存在形式,占其总量的 70% ~ 80%。T $\beta 4$ 是一种多功能的小分子多肽,研究表明,它在免疫功能、神经发育、创伤愈合和肌动蛋白功能等方面发挥重要作用^[21]。最新的研究表明其还与恶性肿瘤的发生^[22]及毛囊发育^[23]有关。本研究为进一步研究 T β 基因在鱼体内的表达方式、功能特点与调控机理以及在免疫应答中的作用机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Goldstein A L, Slater F D, White A. Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1966, 56(3): 1010-1017.
- [2] 王玉树. 胸腺素 β 4 的研究与开发进展[J]. 中国医药生物技术, 2009, 4(1): 43-45.
- [3] Safer D, Elzinga M, Nachmias V T. Thymosin beta4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable [J]. J Biol Chem, 1991, 266(7): 4029-4032.
- [4] Huff T, Zerzawy D, Hannappel E. Interactions of beta-thymosins, thymosin beta4-sulfoxide, and N-terminally truncated thymosin beta4 with actin studied by equilibrium centrifugation, chemical cross-linking and viscometry [J]. Eur J Biochem, 1995, 230(2): 650-657.
- [5] Vigneswaran N, Wu J, Sacks P, et al. Microarray gene expression profiling of cell lines from primary and metastatic tongue squamous cell carcinoma: possible insights from emerging technology [J]. J Oral Pathol Med, 2005, 34(2): 77-86.
- [6] Kobayashi T, Okada F, Fujii N, et al. Thymosin-beta4 regulates motility and metastasis of malignant mouse fibrosarcoma cells [J]. Am J Pathol, 2002, 160(3): 869-882.
- [7] Rho S B, Chun T, Lee S H, et al. The interaction between E-tropomodulin and thymosin beta-10 rescues tumor cells from thymosin beta-10 mediated apoptosis by restoring actin architecture [J]. FEBS Lett, 2004, 557(1-3): 57-63.
- [8] Badamchian M, Fagarasan M O, Danner R L, et al. Thymosin beta (4) reduces lethality and down-regulates inflammatory mediators in endotoxin-induced septic shock [J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3(8): 1225-1233.
- [9] Philp D, Goldstein A L, Kleinman H K. Thymosin beta4 promotes angiogenesis, wound healing, and hair follicle development [J]. Mech Ageing Dev, 2004, 125(2): 113-115.
- [10] Roth L W, Bormann P, Bonnet A, et al. Beta-thymosin is required for axonal tract formation in developing zebrafish brain [J]. Development, 1999, 126(7): 1365-1374.
- [11] Yialouris P P, Coles B, Tsitsiloni O, et al. The complete sequences of trout (*Salmo gairdneri*) thymosin beta 11 and its homologue thymosin beta 12 [J]. Biochem J, 1992, 283(Pt 2): 385-389.
- [12] Low T L, Liu D T, Jou J H. Primary structure of thymosin beta 12, a new member of the beta-thymosin family isolated from perch liver [J]. Arch Biochem Biophys, 1992, 293(1): 32-39.
- [13] Gracey A Y, Troll J V, Somero G N. Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(4): 1993-1998.
- [14] 丰培金, 卢强, 李莲瑞, 等. 鲤外周血白细胞的分离和体外培养 [J]. 中国兽医学报, 2004, 24(4): 369-371.
- [15] 卢强, 丰培金, 李莲瑞, 等. 正常鲤外周血白细胞 cDNA 文库的构建 [J]. 水产学报, 2004, 28(5): 585-588.
- [16] Ito T, Kito K, Adati N, et al. Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer [J]. FEBS Lett, 1994, 351(2): 231-234.
- [17] Jones S W, Cai D, Weislow O S, et al. Generation of multiple mRNA fingerprints using fluorescence-based differential display and an automated DNA sequencer [J]. Biotechniques, 1997, 22(3): 536-539.
- [18] Smith N R, Aldersley M, Li A, et al. Automated differential display using a fluorescently labeled universal primer [J]. Biotechniques, 1997, 23(2): 274-276.
- [19] Erickson-Viitanen S, Horecker B L. Thymosin beta 11: a peptide from trout liver homologous to thymosin beta 4 [J]. Arch Biochem Biophys, 1984, 233(2): 815-820.
- [20] Anathy V, Kirankumar S, Pandian T J. Enhanced expression of beta-thymosin mRNA in the ovary of GnRH analog or estradiol-17beta-treated paradise fish, *Macropodus opercularis* [J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2003, 134(3): 639-645.
- [21] 王先远, 朱晓颖. 胸腺素 β 4 研究概况及展望 [J]. 国外医学预防、诊断、治疗用生物制品分册, 2002, 25(3): 126-129.
- [22] Cha H J, Jeong M J, Kleinman H K. Role of thymosin beta4 in tumor metastasis and angiogenesis [J]. Natl Cancer Inst, 2003, 95(22): 1674-1680.
- [23] Philp D, Nguyen M, Scheremeta B, et al. Thymosin beta4 increases hair growth by activation of hair follicle stem cells [J]. FASEB J, 2004, 18(2): 385-387.

Cloning and sequence analysis of common carp (*Cyprinus carpio* L.) beta-thymosin

FENG Pei-jin^{1,2}, WANG Wen-dong¹, LI Wei¹, HE Jiang-shuai¹,
ZHANG Jun-hui¹, YANG Zhen-guo¹, LU Qiang^{1*}

(1. Institute of Zoonosis, Jilin University, Changchun 130062, China;

2. College of Life Science, Linyi Normal University, Linyi 276005, China)

Abstract: The thymosin β (T β) gene was cloned from the carp peripheral blood leucocytes by fluorescence differential display reverse transcriptase chain reaction (fluoroDDRT-PCR). The full-length thymosin β cDNA was 528 bp with the open reading frame located from 40 bp to 178 bp, encoding 46 amino acid residues. Its 5' untranslated region (UTR) is 39 bp and 3' UTR is 348 bp which contains poly(A) signal (AATAAA) and poly(A) tail. Its GenBank Accession Number is AY457946. The deduced amino acid sequences of the carp T β possessed 84%, 84%, and 84% similarity with the T β a of *Cyprinus carpio*, T β a of *Danio rerio* and beta thymosin-like protein 2 of *Danio rerio*. The carp T β were clustered with T β a of *Cyprinus carpio*, T β a of *Danio rerio*, T β a of *Esox lucius*, T β a of *Salmo salar* and beta thymosin-like protein 2 of *Danio rerio*. It is essential for a complete understanding of the mechanisms of thymosin β in immune response of fish.

Key words: common carp (*Cyprinus carpio*); fluorescence DDRT-PCR; leucocytes; thymosin β

Corresponding author: LU Qiang, E-mail: qlu@jlu.edu.cn

欢迎订阅 2011 年《中国水产科学》

《中国水产科学》为中国水产科学研究院主办的学术性期刊,目前已成为中国水产科学研究领域的重要学术期刊。本刊在促进中国的水产科学、加强国际间学术交流、展示中国水产科学研究领域最新科研成果与研究进展等方面发挥了重要作用。期刊影响因子逐年递增,2008 年中国科技期刊引证报告统计的影响因子值为 0.994, CNKI 期刊统计源影响因子为 1.143; 期刊多次获得“中国百种杰出学术期刊”奖。

本刊主要报道水产生物学基础研究、水生生物病害及其防治、水产生物营养及饲料、渔业生态保护及渔业水域环境保护、水产品保鲜与加工综合利用、水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖以及设施渔业等方面的最新进展、最新成果、最新技术和方法。

本刊为双月刊, A4 开本, 每期 200 页, 单月出版, 国内外公开发行。国内每期定价 30 元, 全年 180 元(含邮费)。国内统一刊号: CN 11-3446/S, 国际标准刊号: ISSN 1005-8737, 邮发代号: 18-250, 国外代号 4639Q。直接向编辑部订阅可享受 8 折优惠, 也可在当地邮电局(所)办理订阅手续(可破季订阅)。漏订或补订当年和过期期刊, 请直接向编辑部订阅。

编辑部地址: 北京市丰台区青塔村 150 号(中国水产科学研究院内)

邮政编码: 100141

联系电话: 010-68673921, 传真: 010-68673931

E-mail: zgsckx@cafs.ac.cn; jfishok@publica.bj.cninfo.net

Website: www.fishscichina.com