

文章编号: 1000-0615(2016)04-0547-11

DOI: 10.11964/jfc.20150910083

α -tubulin基因的克隆、生物信息学分析及其在仿刺参肠道再生过程中的表达模式

王 怡, 高银雪, 湛垚垚, 张向向, 杨立猛, 常亚青*

(大连海洋大学农业部北方海水增殖重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: 为了明确仿刺参 α -微管蛋白(α -tubulin)基因的序列及结构信息, 初步研究该基因在仿刺参肠道再生过程中的生物学功能, 本研究利用转录组数据挖掘和cDNA末端快速扩增技术(RACE)首次克隆得到仿刺参 α -tubulin基因的全长cDNA序列。结果表明, 仿刺参 α -tubulin基因cDNA全长为1641 bp, 共编码453个氨基酸, 经生物信息学分析发现, 该基因的5'端非编码区为153 bp, 3'端非编码区为126 bp, 推算该基因所编码的蛋白质分子量为50.33 ku, 等电点为4.89, 属于亲水性非跨膜蛋白质, 且氨基酸序列中含有微管蛋白特有的信号序列GGGTGSG。通过与13种已公布物种的 α -tubulin氨基酸序列进行多重序列比对及系统进化分析, 发现仿刺参 α -tubulin蛋白的氨基酸序列与其他真核生物的 α -tubulin蛋白序列具有非常高的保守性, 与南极岩斑鳕 α -tubulin相似性高达90%。采用实时定量PCR技术对 α -tubulin基因在仿刺参肠组织再生不同时期的表达情况进行检测, 结果显示 α -tubulin基因在仿刺参肠组织再生不同时期均有表达, 其相对表达量在肠组织再生17 d时最高, 5 d时最低。本研究在获得仿刺参 α -tubulin基因结构信息的同时, 进一步印证了真核生物 α -tubulin基因的高度保守性, 同时表明 α -tubulin基因参与仿刺参肠道再生过程。

关键词: 仿刺参; α -微管蛋白; 克隆; 生物信息学分析; 基因表达

中图分类号: Q 785; S 917.1

文献标志码: A

微管(microtubule)是真核生物细胞骨架组成成分之一, 不仅参与维持细胞形态和调控细胞器空间分布, 还参与细胞分裂、代谢调控、物质转运、信号转导等细胞活动^[1-4]。同时, 微管也是高度动态的有丝分裂纺锤体的主要组成部分, 是纤毛、鞭毛和中心粒中的极稳定成分^[1-4]。研究表明, 微管为直径约25 nm的空心管状结构, 主要由 α 、 β 、 γ 3种微管蛋白(tubulin)组成, 部分真核生物中还存在 δ 、 ϵ 、 ζ 微管蛋白。其中 α 、 β 微管蛋白以异二聚体形式沿纵轴组装构成微管基本结构单位^[1,2]。目前已经成功克隆出了人(*Homo sapiens*)^[5]、小鼠(*Mus musculus*)^[6]、白毛杨(*Populus tomentosa*)^[7]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[8]、太

平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[9]等的 α -微管蛋白(α -tubulin)基因, 并相继开展了 α -tubulin基因的转录后翻译修饰、 α -tubulin基因在植物生长过程中的调控作用以及 α -tubulin蛋白抑制剂研究等方面的工作, 其中对海洋生物 α -tubulin基因的研究工作多集中在环境胁迫下其基因表达和生物学功能等方面^[5-10]。对于棘皮动物 α -tubulin基因的研究甚少, 目前只对海胆*Lytechinus pictus*和*Paracentrotus lividus*的 α -tubulin基因序列、结构及其在胚胎发生过程中的表达模式和作用机制等方面进行过研究^[11-13]。

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)隶属棘皮动物门(Echinodermata), 海参纲(Holothuroidea), 楯手

收稿日期: 2015-09-17 修回日期: 2015-12-30

资助项目: 国家“八六三”高新技术研究发展计划(2012AA10A412); 辽宁省农业攻关及成果产业化项目(2015203003)

通信作者: 常亚青, E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

目(Aspidochirota), 刺参科(Stichopodidae), 仿刺参属(*Apostichopus*), 是无脊椎动物中与脊索动物门(Chordata)最为相似的后口动物类群, 分类地位十分特殊^[14-15]。海参不仅具有较高的营养价值和商业价值, 由于其受到伤害性刺激时会出现“吐脏”现象, 即将大部分消化道和与之相连的组织排出体外, 而在一定时间内又可在体内再生出新的内脏, 充当其消化系统, 因此海参也是目前研究再生过程的模式生物之一^[16-17]。有研究指出, 海参内脏的再生过程包括细胞分裂、细胞迁移、细胞外基质重塑和肌细胞去分化, 其中肌细胞发生是消化道再生最主要的细胞活动之一, 包括肌肉前体细胞增殖、分化和成肌细胞形态学改变等, 这些过程均需要微管蛋白参与^[17-18]。微管蛋白与再生相关这一现象已被许多研究证实, 如Hoffman等^[19]发现微管蛋白与小鼠轴突再生相关且在再生过程中微管蛋白基因表达量升高, Miller等^[20]发现 α -tubulin基因在小鼠面部和坐骨运动神经元的再生过程中表达量显著升高, 这些研究多集中在小鼠神经再生方面, 而在无脊椎动物再生方面鲜有报道。

本研究利用转录组数据挖掘、cDNA末端快速扩增(RACE)技术和实时定量PCR(qRT-PCR)技术, 首次对未得到全长的仿刺参 α -tubulin基因进行了克隆, 利用生物信息学技术分析了该基因的结构特点、编码蛋白质的序列信息、基本特征以及该蛋白质与已知13种真核生物 α -tubulin蛋白之间的分子进化关系。最后, 对该基因在仿刺参肠组织再生不同时期的相对表达量进行了检测, 以期研究 α -tubulin基因参与仿刺参内脏再生过程的作用机制提供更多的基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

α -tubulin基因克隆实验所用仿刺参采自大连旅顺黄金山海域野生群体(121.73 °E, 38.80 °N), 体质量(20.19 ± 5.82)g。在水温16~17 °C下饥饿3 d, 提取3头仿刺参的肠组织混合成一个样本, 备用。

肠道再生实验所用仿刺参采自同海域, 体质量100~130 g。腹腔注射0.35 M的KCl溶液1~2 mL后诱导仿刺参排脏, 并取此时的肠组织作为对照。将排脏后的仿刺参暂养于实验室水池

中, 期间不投饵。在排脏后第3、5、7、10、14、17、21和28天分别取3头仿刺参的肠组织。所有样品经液氮冷冻后, -80 °C保存备用。

1.2 总RNA的提取

仿刺参各个肠组织样品的总RNA提取参照动物组织总RNA提取试剂盒说明书(天根生化科技有限公司, 北京)进行, RNA的完整性经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后, 用Implen Nano Photometer核酸蛋白分析仪(德国)检测其纯度和浓度, 获得的RNA样品于-80 °C保存备用。

1.3 核心片段的获得

从本实验室构建的仿刺参再生转录组中获得 α -tubulin基因的核心片段, 经BLAST比对分析发现该片段与其他物种的基因具有较高同源性, 确定将该序列列为 α -tubulin基因核心片段进行引物设计。

1.4 引物设计

RACE引物经Primer Premier 5.0软件设计后(表1), 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行引物合成。

1.5 RACE扩增

3'RACE和5'RACE第一条链cDNA按照SMARTerTM RACE 5'/3'cDNA扩增试剂盒(Clontech公司, 美国)操作步骤合成, 以TB1-3GSP和TB1-5GSP为特异性引物分别进行3'和5'末端的扩增。3'末端/5'末端的扩增均为50 μ L体系: 去离子水, 15.5 μ L; 2 \times SeqAmp Buffer, 25 μ L; 3' cDNA模板/5' cDNA模板, 2.5 μ L; 10 \times UPM, 5 μ L; 10 μ mol/L的TB1-3GSP和TB1-5GSP, 1 μ L; SeqAmp DNA Polymerase, 1 μ L。3'和5'末端反应条件: 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 3 min, 25个循环。

1.6 PCR产物的克隆与测序

采用EasyPure[®] Quick Gel Extraction Kit胶回收试剂盒(全式金生物技术有限公司, 北京)对RACE扩增获得的PCR产物1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收纯化。将目的片段与pEASY-T1载体连接, 转化Trans1-T1感受态细胞, 37 °C培养过夜。经菌落PCR技术筛选, 对重组子进行鉴定, 将阳性克隆送至生工生物工程(上

表 1 用于 α -tubulin 基因 cDNA RACE 和实时定量 PCR 的引物序列Tab. 1 Primers used for α -tubulin gene cDNA RACE and qRT-PCR

引物 primer	序列 sequence (5'→3')	用途 usage
TB1-3GSP	ATAACGCTGTCCTCACCACCCATAC	3'-RACE PCR
3'-CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN (N = A, C, G, or T; V = A, G, or C)	
TB1-5GSP	AGTTGTATGGGTGGTGAGGACAGCGT	5'-RACE PCR
5'-CDS	5'-(T)25VN-3'(N = A, C, G, or T; V = A, G, or C)	
UMP	TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	3'&5'-RACE PCR
TB1-F	CGATTGAGGTTGGTGTAGGTTGGT	qRT-PCR
TB1-R	GGAGCGTCTGTCTGTTGACTATGG	
Cyt b-F	TGAGCCGCAACAGTAATC	qRT-PCR
Cyt b-R	AAGGGAAAAGGAAGTAAAAG	

海)股份有限公司进行测序。

1.7 序列分析

利用DNASTar中SeqMan软件对测序得到的正反向序列进行组装,并将得到的3'和5'端序列进行组装拼接,得到 α -tubulin基因完整的全长cDNA序列。利用BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)对得到的 α -tubulin基因的全长cDNA序列进行比对分析;采用ORF Finder软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf>)确定该基因的开放阅读框(open reading frame, ORF);应用DNAMAN6.0软件进行仿刺参与其他物种 α -tubulin蛋白的氨基酸序列多重比对,在此基础上,利用MEGA5.0软件,构建基于邻接法(Neighbor-Joining, NJ)的系统进化树; α -tubulin全长cDNA编码的蛋白质序列结构分析由<http://www.cbs.dtu.dk>等网站提供的在线软件分析完成。

1.8 仿刺参 α -tubulin基因在再生不同时期的表达检测

利用PrimeScript™ RT reagent Kit(TaKaRa, 大连)试剂盒将提取得到的仿刺参肠再生阶段样品的总RNA反转录成cDNA,反应体积及条件参照说明书进行。根据得到的 α -tubulin全长cDNA序列设计合成qRT-PCR引物TB1-F/TB1-R,以Cytb作为内参。qRT-PCR所用仪器为ABI公司的7500型(Life Technologies, USA),试剂盒为SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus, TaKaRa)。三步法PCR扩增反应,反应体系为20 μ L,依次向PCR管中加入10 μ L 2 \times SYBR® Premix Ex

Taq™ II (Tli RNaseH Plus), 7.8 μ L ddH₂O, 1 μ L cDNA模板,上下游引物各0.4 μ L, 0.4 μ L ROX Reference Dye II。反应程序为95 °C预变性30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 32 s, 40个循环;熔解曲线阶段95 °C 30 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s, 65 °C→95 °C 10 s/次(升温0.5 °C, 采集荧光)每个实验样本3个重复。

1.9 数据处理

采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法分析 α -tubulin基因在仿刺参肠再生不同阶段的相对表达量,SPSS16.0软件进行ANOVA分析。

2 结果

2.1 仿刺参 α -tubulin基因全长cDNA序列分析

利用RACE技术首次克隆得到仿刺参 α -tubulin基因cDNA序列,并提交GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/923480056?report=genbank>, 登录号: KP939363)。cDNA序列全长为1641 bp,应用ORF Finder分析,该序列包含有1个1362 bp的开放阅读框,编码453个氨基酸,5'端非编码区为153 bp,3'端非编码区为126 bp,并含有一个典型的加尾信号AATAA。经ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam>)软件分析,预测仿刺参 α -tubulin蛋白分子量为50.33 ku,等电点为4.89(图1)。

利用ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale>)

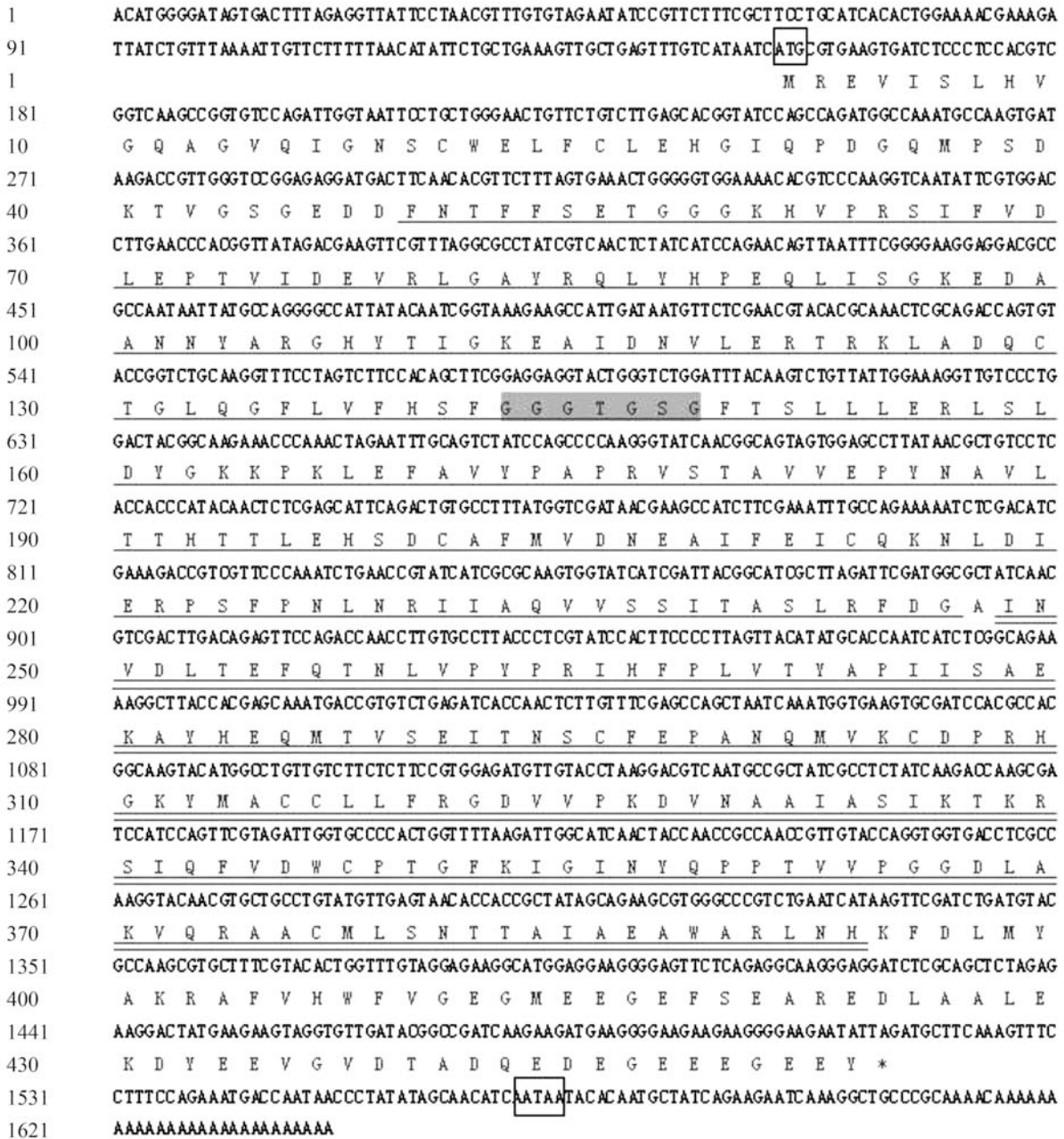


图1 仿刺参α-tubulin基因核苷酸序列及编码氨基酸序列

方框标注代表起始密码子ATG和末端加尾信号AATAA；*为终止密码子TAG；下划线部分为GTP酶结合区；双划线部分为C端结构域；阴影部分为tubulin蛋白的特征信号

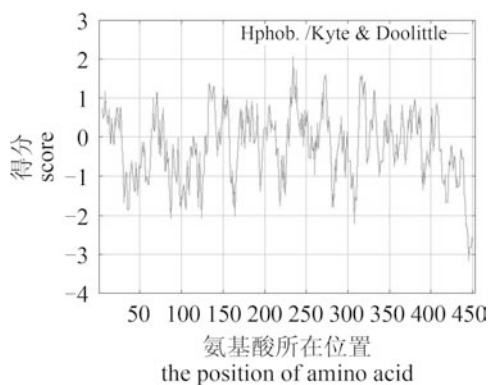
Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of α-tubulin in A. japonicus

The letters in box indicated the start codon (ATG); the polyadenylation signal sequences (AATAAA); asterisk indicated the stop codon (TGA); the GTPase domain is underlined; the C-terminal domain is double underlined and the character signal of tubulin is shaded

在线预测了仿刺参α-tubulin的氨基酸亲/疏水性，结果显示仿刺参α-tubulin蛋白序列中疏水性氨基酸残基所占面积小于亲水性氨基酸残基，其中疏水性最大值为2.067，亲水性最大值为3.156，因此可以推测该蛋白属于亲水性蛋白质(图2)。应用TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>

TMHMM)在线预测α-tubulin蛋白序列跨膜域，结果表明其蛋白序列的肽链跨膜的概率低于0.5，即该蛋白不属于跨膜蛋白类(图3)。

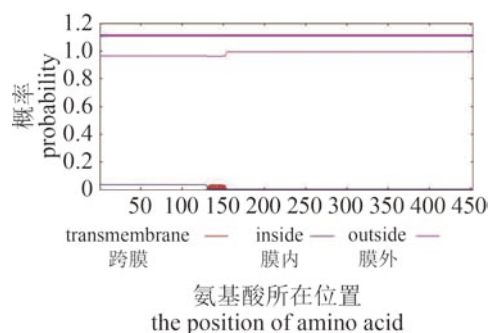
利用蛋白分析软件ScanProsite对获得的仿刺参α-tubulin基因cDNA序列推导翻译的氨基酸序列进行结构分析，该序列在第142~148位氨基酸处

图 2 仿刺参 α -tubulin蛋白疏水性/亲水性分析结果Fig. 2 The hydrophobicity/hydrophilicity results of α -tubulin in *A. japonicus*

存在一个微管蛋白的保守区域GGGTGSG。该序列还有2个显著的结构域家族, Phe49~Gly246位氨基酸为Tubulin/FtsZ family, GTPase domain; Ile248~His393位氨基酸为Tubulin/FtsZ family, C-terminal domain(图1)。

2.2 仿刺参 α -tubulin基因编码的氨基酸序列同源性及其进化分析

在NCBI上对仿刺参 α -tubulin氨基酸序列进行

图 3 仿刺参 α -tubulin蛋白跨膜区分析结果Fig. 3 Prediction results of transmembrane region of α -tubulin in *A. japonicus*

BLAST搜索比对, 其与南极岩斑鳕(*Notothenia coriiceps*) α -tubulin氨基酸序列的一致性最高, 为90%; 与其他脊椎动物如人、小鼠、斑马鱼和非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的一致性均达到88%; 与无脊椎动物紫球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)、商乌贼(*Sepia officinalis*)的一致性为87%。利用DNAMAN6.0软件将刺参 α -tubulin氨基酸序列分别与来自人、小鼠、虾、牡蛎和海胆等动物的13条序列进行一致性和相似性比对分析

表 2 仿刺参 α -tubulin氨基酸序列多重比对和系统进化树所用物种信息Tab. 2 Species information for multiple sequence alignment and phylogenetic analysis for α -tubulin of *A. japonicus*

物种 species	登录号 accession no.
人 (<i>H. sapiens</i>)	AAA91576.1
小鼠 (<i>M. musculus</i>)	NP_033474.1
波斑鸚 (<i>Chlamydotis macqueenii</i>)	KFP42342.1
东美螭 (<i>Notophthalmus viridescens</i>)	CAA83457.1
虹鱒 (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	AAA68904.1
米氏叶吻银鲛 (<i>Callorhynchus milii</i>)	AFM91058.1
斑马鱼 (<i>D. rerio</i>)	AAB84143.1
文昌鱼 (<i>Branchiostoma floridae</i>)	AAM73981.1
黑腹果蝇 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	AAF54067.1
秀丽隐杆线虫 (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	BAA03909.1
斑节对虾 (<i>Penaeus monodon</i>)	AAM73792.1
太平洋牡蛎 (<i>C. gigas</i>)	BAD80736.1
海兔 (<i>Aplysia californica</i>)	AAM09673.1
绿球海胆 (<i>Strongylocentrotus drobachiensis</i>)	AAM73988.1
紫球海胆 (<i>S. purpuratus</i>)	XP_011674549.1
仿刺参 (<i>A. japonicus</i>)	ALB35035.1

(表2), 发现仿刺参 α -tubulin基因编码的氨基酸序列与其他物种的 α -tubulin基因编码的氨基酸序列

的相似性均在87%以上(图4)。

利用MEGA5.0以NJ法构建基于 α -tubulin氨基

人 <i>H. sapiens</i>	MRECISIHVGGAGVQIGN CWEL CLEHGIQDFGQMPDSTK IGG. GDDSF TFFSETGAGN VPRAFVDLEF VIDEIRGTYRQLHPE	90
小鼠 <i>M. musculus</i>	MRECISIHVGGAGVQIGN CWEL CLEHGIQDFGQMPDSTK IGG. GDDSF TFFSETGAGN VPRAFVDLEF VIDEIRGTYRQLHPE	90
波斑鸭 <i>C. macqueenii</i>	. RECISIHIGQAGVQIGN SCWEL CLEHGIQDFGQMPDSTK IGG. GDDSF TFFSETGAGN VPRAFVDLEF VIDEIRGTYRQLHPE	89
东美螯 <i>N. viridescens</i>	MRECISIHVGGAGVQIGN CWEL CLEHGIQDFGQMPDSTK IGG. GDDSF TFFSETGAGN VPRAFVDLEF VIDEIRGTYRQLHPE	90
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	MRECISIHVGGAGVQIGN CWEL CLEHGIQDFGQMPDSTK IGG. GDDSF TFFSETGAGN VPRAFVDLEF VIDEIRGTYRQLHPE	90
米氏叶吻银鲛 <i>C. milii</i>	MRECISIHVGGAGVQIGN CWEL CLEHGIQDFGQMPDSTK IGG. GDDSF TFFSETGAGN VPRAFVDLEF VIDEIRGTYRQLHPE	90
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	MRECISIHVGGAGVQIGN CWEL CLEHGIQDFGQMPDSTK IGG. GDDSF TFFSETGAGN VPRAFVDLEF VIDEIRGTYRQLHPE	90
黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	MRECISIHVGGAGVQIGN CWEL CLEHGIQDFGQMPDSTK IGG. GDDSF TFFSETGAGN VPRAFVDLEF VIDEIRGTYRQLHPE	90
秀丽隐杆线虫 <i>C. elegans</i>	MREVSIHVGGAGVQIGN CWEL CLEHGIQDFGQMPDSTK IGG. GDDSF TFFSETGAGN VPRAFVDLEF VIDEIRGTYRQLHPE	88
斑节对虾 <i>P. monodon</i>	MRECISIHVGGAGVQIGN CWEL CLEHGIQDFGQMPDSTK IGG. GDDSF TFFSETGAGN VPRAFVDLEF VIDEIRGTYRQLHPE	90
太平洋牡蛎 <i>C. gigas</i>	MRECISIHVGGAGVQIGN CWEL CLEHGIQDFGQMPDSTK IGG. GDDSF TFFSETGAGN VPRAFVDLEF VIDEIRGTYRQLHPE	90
绿球海胆 <i>S. drobachiensis</i> GN CWEL CLEHGIQDFGQMPDSTK IGG. GDDSF TFFSETGAGN VPRAFVDLEF VIDEIRGTYRQLHPE	74
紫球海胆 <i>S. purpuratus</i>	MRECISIHVGGAGVQIGN CWEL CLEHGIQDFGQMPDSTK IGG. GDDSF TFFSETGAGN VPRAFVDLEF VIDEIRGTYRQLHPE	91
仿刺参 <i>A. japonicus</i>	MREVSIHVGGAGVQIGN CWEL CLEHGIQDFGQMPDSTK IGG. GDDSF TFFSETGAGN VPRAFVDLEF VIDEIRGTYRQLHPE	90
consensus	gn cwel clehgi dg f tffs t g vpr fvdlep v de r g y l hpe	
人 <i>H. sapiens</i>	Q I I G K E D A A N N Y A R G H Y T I G K E I D V L D R I R K L D G C T L Q G L F I F H S F G G G T G S G F T S L L M E R L S V D Y G K K S K L E F S I Y P A P Q V S T A V	181
小鼠 <i>M. musculus</i>	Q I I G K E D A A N N Y A R G H Y T I G K E I D V L D R I R K L D G C T L Q G L F I F H S F G G G T G S G F T S L L M E R L S V D Y G K K S K L E F S I Y P A P Q V S T A V	181
波斑鸭 <i>C. macqueenii</i>	Q I I S G K E D A A N N Y A R G H Y T I G K E I D V L D R I R K L D G C T L Q G L F I F H S F G G G T G S G F T S L L M E R L S V E Y G K K S K L E F S I Y P A P R V S T A V	180
东美螯 <i>N. viridescens</i>	Q I I S G K E D A A N N Y A R G H Y T I G K E I D V L D R I R K L D G C T L Q G L F I F H S F G G G T G S G F T S L L M E R L S V D Y G K K S K L E F S I Y P A P Q V S T A V	181
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	Q I I G K E D A A N N Y A R G H Y T I G K E I D V L D R I R K L D G C T L Q G L F I F H S F G G G T G S G F A S L L M E R L S V D Y G K K S K L E F A I Y P A P Q V S T A V	181
米氏叶吻银鲛 <i>C. milii</i>	Q I I G K E D A A N N Y A R G H Y T I G K E I D V L D R I R K L D G C T L Q G L F I F H S F G G G T G S G F T S L L M E R L S V D Y G K K S K L E F A I Y P A P Q I S T A V	181
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	Q I I G K E D A A N N Y A R G H Y T I G K E I D V L D R I R K L D G C T L Q G L F I F H S F G G G T G S G F T S L L M E R L S V D Y G K K S K L E F S I Y P A P Q V S T A V	181
黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	Q I I G K E D A A N N Y A R G H Y T I G K E I D V L D R I R K L D G C T L Q G L F I F H S F G G G T G S G F T S L L M E R L S V D Y G K K S K L E F A I Y P A P Q V S T A V	181
秀丽隐杆线虫 <i>C. elegans</i>	Q I I G K E D A A N N Y A R G H Y T I G K E I D V L D R I R K L D G C T L Q G L F I F H S F G G G T G S G F T S L L M E R L S V D Y G K K S K L E F S I Y P A P Q V C T A V	179
斑节对虾 <i>P. monodon</i>	Q I I G K E D A A N N Y A R G H Y T I G K E I D V L D R I R K L D G C T L Q G L F I F H S F G G G T G S G F A S L L T E R L S V D Y G K K S K L E F A I Y P A P Q V S T A V	140
太平洋牡蛎 <i>C. gigas</i>	Q I I G K E D A A N N Y A R G H Y T I G K E I D V L D R I R K L D G C T L Q G L F I F H S F G G G T G S G F A S L L T E R L S V D Y G K K S K L E F A I Y P A P Q V S T A V	181
绿球海胆 <i>S. drobachiensis</i>	Q I I G K E D A A N N Y A R G H Y T I G K E I D V L D R I R K L D G C T L Q G L F I F H S F G G G T G S G F T S L L M E R L S V D Y G K K S K L E F A I Y P A P Q I S T A V	165
紫球海胆 <i>S. purpuratus</i>	Q I I G K E D A A N N Y A R G H Y T I G K E I D V L D R I R K L D G C T L Q G L F I F H S F G G G T G S G F A S L L M E R L S V D Y G K K S K L O F A I Y P A P Q V S T A V	182
仿刺参 <i>A. japonicus</i>	Q I I S G K E D A A N N Y A R G H Y T I G K E I D V L D R I R K L D G C T L Q G L F I F H S F G G G T G S G F T S L L M E R L S L D Y G K K P A L E F A I Y P A P R V S T A V	181
consensus	q i gkedaannyarghyt gke d v r d c lqgf fhs	
人 <i>H. sapiens</i>	VEPYNLITHTTLEHSDCAFVMDNEA IYD ICRNRLD IERP TYNLNRLI SQIVSSITASLRFDGALNVDL TEFQTNLVPPYRIHFPLATY	272
小鼠 <i>M. musculus</i>	VEPYNLITHTTLEHSDCAFVMDNEA IYD ICRNRLD IERP TYNLNRLI SQIVSSITASLRFDGALNVDL TEFQTNLVPPYRIHFPLATY	272
波斑鸭 <i>C. macqueenii</i>	VEPYNLITHTTLEHSDCAFVMDNEA IYD ICRNRLD IERP TYNLNRLI SQIVSSITASLRFDGALNVDL TEFQTNLVPPYRIHFPLATY	271
东美螯 <i>N. viridescens</i>	VEPYNLITHTTLEHSDCAFVMDNEA IYD ICRNRLD IERP SYNLNRLI SQIVSSITASLRFDGALNVDL TEFQTNLVPPYRIHFPLATY	272
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	VEPYNLITHTTLEHSDCAFVMDNEA IYD ICRNRLD IERP TYNLNRLI SQIVSSITASLRFDGALNVDL TEFQTNLVPPYRIHFPLATY	272
米氏叶吻银鲛 <i>C. milii</i>	VEPYNLITHTTLEHSDCAFVMDNEA IYD ICRNRLD IERP TYNLNRLI SQIVSSITVSLRFDGALNVDL TEFQTNLVPPYRIHFPLATY	272
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	VEPYNLITHTTLEHSDCAFVMDNEA IYD ICRNRLD IERP TYNLNRLI SQIVSSITASLRFDGALNVDL TEFQTNLVPPYRIHFPLATY	272
黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	VEPYNLITHTTLEHSDCAFVMDNEA IYD ICRNRLD IERP TYNLNRLI SQIVSSITASLRFDGALNVDL TEFQTNLVPPYRIHFPLATY	272
秀丽隐杆线虫 <i>C. elegans</i>	VEPYNLITHTTLEHSDCAFVMDNEA IYD ICRNRLD IERP SYNLNRLI SQIVSSITASLRFDGALNVDL TEFQTNLVPPYRIHFPLAAV	270
斑节对虾 <i>P. monodon</i>	VEPYNLITHTTLEHSDCAFVMDNEA IYD ICRNRLD IERP TYNLNRLI SQIVSSITASLRFDGALNVDL TEFQTNLVPPYRIHFPLATY	140
太平洋牡蛎 <i>C. gigas</i>	VEPYNLITHTTLEHSDCAFVMDNEA IYD ICRNRLD IERP TYNLNRLI SQIVSSITASLRFDGALNVDL TEFQTNLVPPYRIHFPLATY	272
绿球海胆 <i>S. drobachiensis</i>	VEPYNLITHTTLEHSDCAFVMDNEA IYD ICRNRLD IERP TYNLNRLI SQIVSSITASLRFDGALNVDL TEFQTNLVPPYRIHFPLATY	256
紫球海胆 <i>S. purpuratus</i>	VEPYNLITHTTLEHSDCAFVMDNEA IYD ICRNRLD IERP SYNLNRLI SQIVSSITASLRFDGALNVDL TEFQTNLVPPYRIHFPLATY	273
仿刺参 <i>A. japonicus</i>	VEPYNLITHTTLEHSDCAFVMDNEA IYD ICRNRLD IERP SYNLNRLI SQIVSSITASLRFDGALNVDL TEFQTNLVPPYRIHFPLATY	272
consensus		
人 <i>H. sapiens</i>	APVISAERKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMKCDPRHGKYMAGCLLYRGDVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPGTFKVGINYPPTVV	363
小鼠 <i>M. musculus</i>	APVISAERKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMKCDPRHGKYMAGCLLYRGDVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPGTFKVGINYPPTVV	363
波斑鸭 <i>C. macqueenii</i>	APVISAERKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMKCDPRHGKYMAGCLLYRGDVPKDVNAAIATIKTKRSIQFVDWCPGTFKVGINYPPTVV	362
东美螯 <i>N. viridescens</i>	APVISAERKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMKCDPRHGKYMAGCLLYRGDVPKDVNAAIATIKTKRSIQFVDWCPGTFKVGINYPPTVV	363
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	APVISAERKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMKCDPRHGKYMAGCLLYRGDVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPGTFKVGINYPPTVV	363
米氏叶吻银鲛 <i>C. milii</i>	APVISAERKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMKCDPRHGKYMAGCLLYRGDVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPGTFKVGINYPPTVV	363
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	APVISAERKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMKCDPRHGKYMAGCLLYRGDVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPGTFKVGINYPPTVV	363
黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	APVISAERKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMKCDPRHGKYMAGCLLYRGDVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPGTFKVGINYPPTVV	363
秀丽隐杆线虫 <i>C. elegans</i>	APVISAERKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMKCDPRHGKYMAGCLLYRGDVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPGTFKVGINYPPTVV	364
斑节对虾 <i>P. monodon</i>	APVISAERKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMKCDPRHGKYMAGCLLYRGDVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPGTFKVGINYPPTVV	361
太平洋牡蛎 <i>C. gigas</i>	APVISAERKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMKCDPRHGKYMAGCLLYRGDVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPGTFKVGINYPPTVV	140
绿球海胆 <i>S. drobachiensis</i>	APVISAERKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMKCDPRHGKYMAGCLLYRGDVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPGTFKVGINYPPTVV	363
紫球海胆 <i>S. purpuratus</i>	APVISAERKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMKCDPRHGKYMAGCLLYRGDVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPGTFKVGINYPPTVV	347
仿刺参 <i>A. japonicus</i>	APVISAERKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMKCDPRHGKYMAGCLLYRGDVPKDVNAAIATIKTKRSIQFVDWCPGTFKVGINYPPTVV	364
consensus	APVISAERKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMKCDPRHGKYMAGCLLYRGDVPKDVNAAIATIKTKRSIQFVDWCPGTFKVGINYPPTVV	363
人 <i>H. sapiens</i>	PGGDLAKVQRAVCMLSNNTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGGEMEEGFESEAREDLAALKDYEEVGVDSVEGEAEEGEEY.	451
小鼠 <i>M. musculus</i>	PGGDLAKVQRAVCMLSNNTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGGEMEEGFESEAREDLAALKDYEEVGVDSVEGEAEEGEEY.	449
波斑鸭 <i>C. macqueenii</i>	PGGDLAKVQRAVCMLSNNTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGGEMEEGFESEAREDLAALKDYEEVGVDSVEGEAEEGEEY.	443
东美螯 <i>N. viridescens</i>	PGGDLAKVQRAVCMLSNNTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGGEMEEGFESEAREDLAALKDYEEVGVDSVEGEAEEGEEY.	450
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	PGGDLAKVQRAVCMLSNNTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGGEMEEGFESEAREDLAALKDYEEVGVDSVEGEAEEGEEY.	450
米氏叶吻银鲛 <i>C. milii</i>	PGGDLAKVQRAVCMLSNNTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGGEMEEGFESEAREDLAALKDYEEVGVDSVEGEAEEGEEY.	449
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	PGGDLAKVQRAVCMLSNNTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGGEMEEGFESEAREDLAALKDYEEVGVDSVEGEAEEGEEY.	449
黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	PGGDLAKVQRAVCMLSNNTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGGEMEEGFESEAREDLAALKDYEEVGVDSVEGEAEEGEEY.	450
秀丽隐杆线虫 <i>C. elegans</i>	PGGDLAKVQRAVCMLSNNTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGGEMEEGFESEAREDLAALKDYEEVGVDSVEGEAEEGEEY.	449
斑节对虾 <i>P. monodon</i>	PGGDLAKVQRAVCMLSNNTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGGEMEEGFESEAREDLAALKDYEEVGVDSVEGEAEEGEEY.	140
太平洋牡蛎 <i>C. gigas</i>	PGGDLAKVQRAVCMLSNNTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGGEMEEGFESEAREDLAALKDYEEVGVDSVEGEAEEGEEY.	452
绿球海胆 <i>S. drobachiensis</i>	PGGDLAKVQRAVCMLSNNTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGGEMEEGFESEAREDLAALKDYEEVGVDSVEGEAEEGEEY.	396
紫球海胆 <i>S. purpuratus</i>	PGGDLAKVQRAVCMLSNNTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGGEMEEGFESEAREDLAALKDYEEVGVDSVEGEAEEGEEY.	452
仿刺参 <i>A. japonicus</i>	PGGDLAKVQRAVCMLSNNTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGGEMEEGFESEAREDLAALKDYEEVGVDSVEGEAEEGEEY.	452
consensus		

图4 仿刺参与其他物种的 α -tubulin基因编码氨基酸序列比对

Fig. 4 Multiple sequence alignment of the α -tubulin encoded amino acid sequences from *A. japonicus* and other species

酸序列的分子系统进化树(表2)。进化树聚类结果显示人、小鼠和斑马鱼作为脊椎动物聚为一支, 与无脊椎动物分开。在无脊椎动物文昌鱼、黑腹果蝇、太平洋牡蛎和海兔这一支中, 由 α -tubulin氨基酸序列所反映的系统发育关系符合生物在进化上的地位关系(图5)。

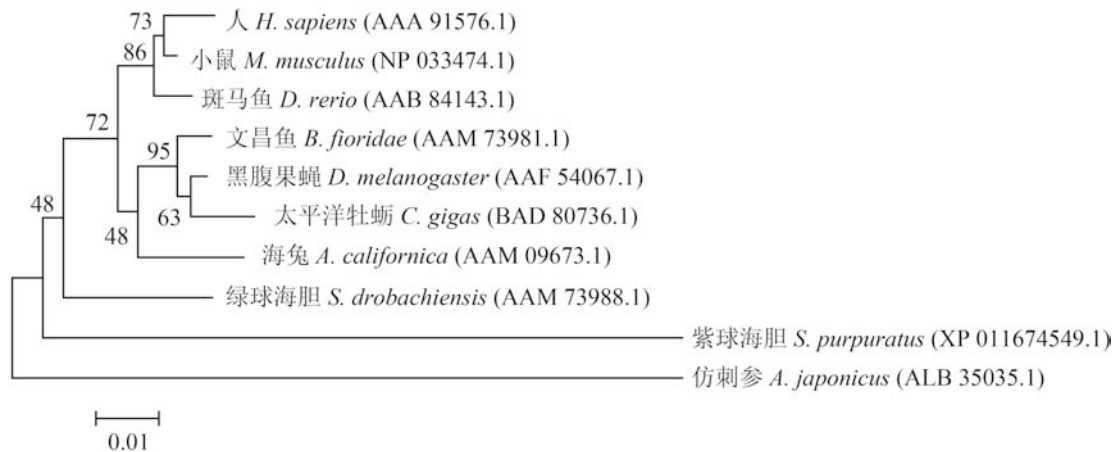


图 5 仿刺参 α -tubulin氨基酸序列聚类分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of α -tubulin amino acid sequences of *A. japonicus*

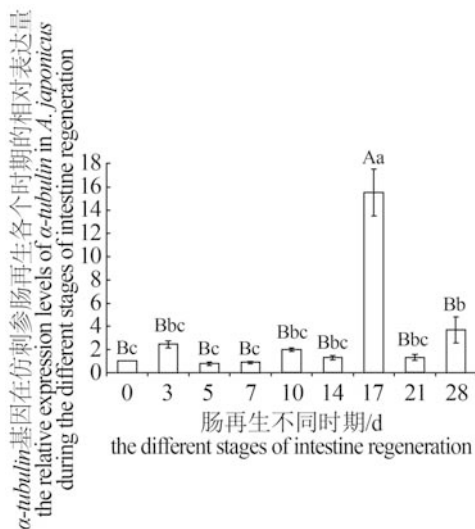


图 6 qRT-PCR检测仿刺参肠再生各个时期的 α -tubulin基因相对表达量

柱上不同小写字母表示不同时期存在显著差异($P < 0.05$), 不同大写字母表示不同时期存在极显著差异($P < 0.01$)

Fig. 6 The relative expression levels of α -tubulin in *A. japonicus* during the different stages of intestine regeneration by qRT-PCR

Histogram bars with different small letters indicate significant differences ($P < 0.05$), histogram bars with different capital letters indicate extremely significant differences ($P < 0.01$)

2.3 α -tubulin基因在仿刺参肠组织再生时期的相对表达

α -tubulin基因在仿刺参肠组织不同再生时期中都有表达(图6), 不存在肠再生时期特异性, 其相对表达量在肠组织再生的第17天最高, 第5天时表达量最低。其中17 d的相对表达量为

15.521, 与其他再生时期的相对表达量存在极显著差异($P < 0.01$); 而再生28 d的相对表达量与再生0、5和7 d的相对表达量呈现显著差异($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究通过转录组数据挖掘和RACE技术, 首次扩增得到仿刺参 α -tubulin cDNA全长序列。通过生物信息学分析发现, 仿刺参 α -tubulin基因与已知的13种生物的 α -tubulin基因具有高度的保守性。多重序列比对结果显示, 仿刺参 α -tubulin基因编码蛋白的区域与一些已知物种的 α -tubulin蛋白的保守区相吻合, 尤其是GTP核苷酸结合位点(GGGTGSG), 该位点是 α 、 β -微管蛋白聚合的关键。GTP与 β -微管蛋白结合后发生水解, 促进微管的聚合^[21]。利用GenBank的BLAST分析发现, 该基因蛋白质序列与人、小鼠和斑马鱼等脊椎动物的相似性达到88%; 与紫球海胆, 商乌贼等无脊椎动物的相似性也达到了87%以上, 这一结论进一步证实了 α -tubulin基因在真核生物中是高度保守的^[1]。

Sun等^[22]对与仿刺参肠再生关键阶段相关的

细胞骨架基因进行qRT-PCR时发现, α -tubulin基因表达量在再生3、7、14和21 d呈逐渐上升状态。本实验中 α -tubulin基因在肠再生不同时期均有所表达, 不同时期的表达量存在一定差异, 在第17天时的相对表达量最大。这一结果与Sun等^[22]研究结果有所不同, 分析其原因可能是由于2个研究中, 仿刺参的饲养环境、体质等不同, 进而影响其内脏再生的速度和进程, 在分子层面则表现为再生相关基因的表达模式不同^[23-24]。此外, Ortiz等^[25]研究*Holothuria glaberrima*肠再生过程中的基因表达变化时, 发现 α -tubulin基因在再生3、7和14 d时均呈显著上调状态。由此可见, α -tubulin基因在不同海参肠再生过程中表达模式不是完全一样的, 可能存在种属差异。

仿刺参肠组织再生包括伤口愈合阶段、原基形成阶段、肠管雏形形成阶段、肠管形成阶段、功能分化阶段和生长阶段, 其中肠管形成阶段和功能分化阶段的细胞增殖活动最为活跃^[24, 26-27]。微管除参与细胞增殖有丝分裂的纺锤体形成外, 还参与细胞分化。微管可维持肌肉细胞内结构层次, 将细胞质和细胞器与肌纤维膜相连接^[28], 也可通过改变突触结构, 运输与突触功能相关的基本成分调控神经细胞形态^[29]。本实验中 α -tubulin基因在肠再生17 d时极显著表达, 表明该阶段出现大量细胞增殖, 推测此时仿刺参正处于肠管形成阶段或功能分化阶段。在肠管形成过程中, 细胞去分化, 随之分裂, 表现为细胞增殖; 功能分化过程中部分组织由单层变为多层, 表现为细胞增殖; 细胞再分化, 表现为细胞骨架改变, 肌细胞变化也主要发生在这一过程^[18, 24, 26]。上述仿刺参肠再生过程均涉及到微管蛋白, 可能引起 α -tubulin基因表达量的变化, 正如某些昆虫从幼虫到成虫转变时发生包括细胞形态和功能上的一些改变, 也可能与 α -tubulin基因表达变化有关^[30]。本实验中, α -tubulin基因在肠再生早期阶段表达量并未明显上升, 到再生中后期表达量突然升高, 这与孙丽娜^[26]在仿刺参再生过程中对细胞增殖时空模式的研究结果相符, 即再生早期细胞增殖活动不明显, 再生中后期肠腔上皮层、浆膜层和肌肉层细胞增殖越发明显, 再生到一定程度时细胞增殖活动开始减弱。此外 α -tubulin基因在肠再生过程中的表达也在一定程度上证实了孙丽娜^[26]关于仿刺参肠由早期细胞迁移为主的变形再生逐

渐演变为以细胞增殖为主的新建再生的推测。

α -tubulin作为真核生物管家基因的重要成员和生物体细胞骨架的基本组成之一, 对维持细胞生命活动必不可少^[1, 31]。学者在进行荧光定量PCR、基因芯片等分子生物学实验时常常选择管家基因作为内参基因使用^[31]。Zhao等^[32]选取了包含 α -tubulin在内的8个候补内参基因对仿刺参夏眠状态下的肠、呼吸树和肌肉3种组织进行qRT-PCR, 对其候补内参基因的表达稳定性进行评估, 结果表明 α -tubulin基因只在肌肉组织中稳定性表达。鲍相渤等^[33]也利用qRT-PCR对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)内参基因的稳定性进行分析比较, 发现 α -tubulin基因在饥饿胁迫处理前后及急性感染后的虾夷扇贝组织中能够作为内参相对准确地对目的基因的表达进行定量, 在升温条件下则不可作为内参基因使用。本实验结果显示, α -tubulin基因在仿刺参肠组织再生过程中表达不稳定, 提示在研究仿刺参内脏再生过程时, α -tubulin基因不应作为内参基因使用。但 α -tubulin基因在仿刺参不同组织间是否差异性表达, 其能否作为内参基因使用仍有待进一步研究和验证。

参考文献:

- [1] Wade R H. On and around microtubules: an overview [J]. *Molecular Biotechnology*, 2009, 43(2): 177-191.
- [2] Hammond J W, Cai D W, Verhey K J. Tubulin modifications and their cellular functions [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2008, 20(1): 71-76.
- [3] Dutcher S K. The tubulin fraternity: alpha to eta [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, 13(1): 49-54.
- [4] Dutcher S K. Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin super family [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(6): 634-640.
- [5] Cowan N J, Dobner P R, Fuchs E V, et al. Expression of human alpha-tubulin genes: interspecies conservation of 3' untranslated regions [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1983, 3(10): 1738-1745.
- [6] Zhao M, Ko S Y, Liu J H, et al. Inhibition of microtubule assembly in osteoblasts stimulates bone morphogenetic protein 2 expression and bone formation through transcription factor Gli2 [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2009, 29(5): 1291-1305.
- [7] 饶国栋, 睢金凯, 张建国. 毛白杨 α -微管蛋白基因家族

- 的克隆与序列分析[J]. 林业科学研究, 2015, 28(1): 44-49.
- Rao G D, Sui J K, Zhang J G. Cloning and sequences analysis of α -tubulin genes family in *Populus tomentosa* [J]. Forest Research, 2015, 28(1): 44-49 (in Chinese).
- [8] Bormann P, Zumsteg V M, Roth L W A, *et al.* Target contact regulates GAP-43 and α -tubulin mRNA levels in regenerating retinal ganglion cells [J]. Journal of Neuroscience Research, 1998, 52(4): 405-419.
- [9] Miyamoto H, Hamaguchi M, Okoshi K. Analysis of genes expressed in the mantle of oyster *Crassostrea gigas* [J]. Fisheries Science, 2002, 68(3): 651-658.
- [10] Hashim S, Hachinohe M, Matsumoto H. Cloning and expression analysis of alpha-tubulin genes in water foxtail (*Alopecurus aequalis*) [J]. Weed Science, 2010, 58(2): 89-95.
- [11] Gong Z, Brandhorst B P. Multiple levels of regulation of tubulin gene expression during sea urchin embryogenesis [J]. Developmental Biology, 1988, 130(1): 144-153.
- [12] Costa S, Ragusa M A, Drago G, *et al.* Sea urchin neural $\alpha 2$ tubulin gene: isolation and promoter analysis [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 316(2): 446-453.
- [13] Ragusa M A, Longo V, Emanuele M, *et al.* In silico characterization of the neural alpha tubulin gene promoter of the sea urchin embryo *Paracentrotus lividus* by phylogenetic footprinting [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(3): 2633-2644.
- [14] 李霞, 王雪, 秦艳杰, 等. 仿刺参EGFR基因的克隆与表达分析[J]. 水产学报, 2012, 36(1): 41-49.
- Li X, Wang X, Qin Y J, *et al.* Cloning and expression analysis of the EGFR gene in *Apostichopus japonicus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(1): 41-49 (in Chinese).
- [15] 杨爱馥, 周遵春, 孙大鹏, 等. 仿刺参铁蛋白ferritin基因的序列分析及表达[J]. 水产学报, 2010, 34(6): 710-717.
- Yang A F, Zhou Z C, Sun D P, *et al.* Sequence analysis and expression pattern of ferritin gene in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(6): 710-717 (in Chinese).
- [16] San M R J E, García A J E. Common cellular events occur during wound healing and organ regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*[J]. BMC Developmental Biology, 2007, 7(1): 115.
- [17] García A J E, Valentín T G, Flores J E, *et al.* Cell dedifferentiation and epithelial to mesenchymal transitions during intestinal regeneration in *H. glaberrima*[J]. BMC Developmental Biology, 2011, 11(1): 61.
- [18] Murray G, García A J E. Myogenesis during holothurian intestinal regeneration[J]. Cell and Tissue Research, 2004, 318(3): 515-524.
- [19] Hoffman P N, Cleveland D W. Neurofilament and tubulin expression recapitulates the developmental program during axonal regeneration: Induction of a specific beta-tubulin isotype[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988, 85(12): 4530-4533.
- [20] Miller F D, Tetzlaff W, Bisby M A, *et al.* Rapid induction of the major embryonic α -tubulin mRNA, $T\alpha 1$, during nerve regeneration in adult rats [J]. The Journal of Neuroscience, 1989, 9(4): 1452-1463.
- [21] Kirschner M, Mitchison T. Beyond self-assembly: From microtubules to morphogenesis [J]. Cell, 1986, 45(3): 329-342.
- [22] Sun L N, Yang H S, Chen M Y, *et al.* RNA-Seq reveals dynamic changes of gene expression in key stages of intestine regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e69441.
- [23] 郑法新, 孙修勤, 张进兴. 刺参吐脏再生的组织学研究[J]. 中国水产科学, 2006, 13(1): 134-139.
- Zheng F X, Sun X Q, Zhang J X. Histological studies on evisceration and regeneration in *Apostichopus japonicus* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1): 134-139 (in Chinese).
- [24] 王霞, 李霞. 仿刺参消化道的再生形态学与组织学[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(5): 340-346.
- Wang X, Li X. The morphological and histological observation of regeneration of alimentary tract in sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2007, 22(5): 340-346 (in Chinese).
- [25] Ortiz P P A, Ramirez G F, Perez O J, *et al.* Gene expression profiling of intestinal regeneration in the sea cucumber [J]. BMC Genomics, 2009, 10(1): 262.
- [26] 孙丽娜. 仿刺参*Apostichopus japonicus* (Selenka)消化道再生的组织细胞特征与关键基因分析[D]. 青岛: 中国科学院大学, 2013.
- Sun L N. Histocytological events and analysis of key

- genes during intestine regeneration in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) [D]. Qingdao: University of Chinese Academy of Sciences, 2013, (in Chinese).
- [27] García A J E, Estrada R L, Santiago R, *et al.* Cellular mechanisms of intestine regeneration in the sea cucumber, *Holothuria glaberrima* Selenka (Holothuroidea: Echinodermata)[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1998, 281(4): 288-304.
- [28] Kostin S, Heling A, Hein S, *et al.* The protein composition of the normal and diseased cardiac myocyte [J]. *Heart Failure Reviews*, 1998, 2(4): 245-260.
- [29] Ottaviani M F, Pregolato M, Cangiotti M, *et al.* Spin probe analysis of microtubules structure and formation [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2012, 522(1): 1-8.
- [30] 闫硕, 朱家林, 朱威龙, 等. 棉铃虫 α -微管蛋白基因的克隆、序列分析及表达模式检测[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(9): 1808-1817.
- Yan S, Zhu J L, Zhu W L, *et al.* Molecular cloning, sequence analysis and expression pattern detection of α -Tubulin gene from *Helicoverpa armigera* (Hübner) [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(9): 1808-1817 (in Chinese).
- [31] Zheng W J, Sun L. Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real time RT-PCR analysis of gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(2): 638-645.
- [32] Zhao Y, Chen M Y, Wang T M, *et al.* Selection of reference genes for qRT-PCR analysis of gene expression in sea cucumber *Apostichopus japonicus* during aestivation [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2014, 32(6): 1248-1256.
- [33] 鲍相渤, 刘卫东, 姜冰, 等. 内参基因在虾夷扇贝定量PCR中表达稳定性的比较[J]. *水产科学*, 2011, 30(10): 603-608.
- Bao X B, Liu W D, Jiang B, *et al.* Expression stability of reference genes for quantitative PCR in Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* [J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(10): 603-608 (in Chinese).

Molecular cloning, bioinformatics analysis and expression pattern detection of α -tubulin gene during intestinal regeneration in the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)

WANG Yi, GAO Yinxue, ZHAN Yaoyao, ZHANG Xiangxiang, YANG Limeng, CHANG Yaqing*

(Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture,
Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract: In this study, full-length cDNA of α -tubulin in sea cucumber *Apostichopus japonicus* was cloned for the first time by transcriptome data mining and rapid amplification of cDNA ends (RACE), and qRT-PCR was used to preliminarily reveal the biology function of α -tubulin in the process of intestine regeneration. The results showed that full-length cDNA of α -tubulin was 1641 bp, containing a 1362 bp open reading frame encoding a putative polypeptide of 453 amino acids residues. Bioinformatics analysis showed that the sequence of α -tubulin contains a 5'-untranslated region (UTR) of 153 bp, and a 3'-UTR of 126 bp. The predicted molecular mass of the deduced amino acid of α -tubulin was 50.33 ku, and the theoretical isoelectric point was 4.89. The amino acids inferred have a special sequence (GGGTGSG) which was a typical element in α -tubulin protein, belonging non-transmembrane and hydrophilic protein. Multiple sequence alignment analysis and phylogenetic analysis revealed that the α -tubulin in sea cucumber was very conservative with other eukaryotic organism and had 90% sequence identity with *Notothenia coriiceps*. Real-time quantitative PCR was carried out to measure the expression level of α -tubulin gene in different stages of sea cucumber intestine regeneration. The expression of α -tubulin was detected at all stages of intestine regeneration. The maximum and the minimum expression levels were found on 17th and 5th day, respectively. This study first obtained the structure information of α -tubulin gene in sea cucumber, and further certified the high homology of α -tubulin in eukaryote. In addition, our results indicated that α -tubulin plays an important role during intestinal regeneration in the sea cucumber *A. japonicus*.

Key words: *Apostichopus japonicus*; α -tubulin; cloning; bioinformatics analysis; gene expression

Corresponding author: CHANG Yaqing. E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

Funding projects: National High Technology Research and Development Program 863 (2012AA10A412); Agricultural & Achievements Industrialization Project of Liaoning Province (2015203003)