

第 31 卷第 4 期
2009 年 8 月

江西农业大学学报
Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis

Vol 31, No. 4
Aug, 2009

文章编号: 1000 - 2286 (2009) 04 - 0723 - 04

虹鳟鱼 *trapd* 基因 cDNA 的克隆与序列特征分析

王家庆¹, 刘晓慧², 郭冉¹, 李代宗¹, 王志平^{1,3}, 张辉¹

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

摘要: 易位子相关蛋白 (translocon associated protein delta, TRAPD) 是作为内质网膜蛋白参与细胞内信号序列识别、新生肽链的修饰、转运通道的形成等过程。以虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 为研究材料, 采用 RT-PCR 和 RACE 法分离和克隆虹鳟鱼 *trapd* 基因 cDNA 的全长序列 (GenBank 登录号: FJ591154), 序列全长 949 bp, 其中 5' 端非翻译区 (UTR) 长 109 bp, 3' 端非翻译区 (UTR) 长 336 bp, 开放性阅读框 (ORF) 长 504 bp, 编码 167 个氨基酸, 存在 1 个跨膜区。虹鳟 TRAPD 蛋白序列与斑马鱼、黑青斑河豚、大西洋鲑、斑点叉尾鮰、热带爪蟾、人和小鼠等脊椎动物的同源性均在 80% 左右, 表明 *trapd* 基因在进化过程中是高度保守的。

关键词: 虹鳟鱼; *trapd* 基因; RT-PCR; RACE

中图分类号: S965.122 **文献标识码:** A

The Cloning and Analysis of *trapd* Full-length cDNA Derived from *Oncorhynchus mykiss*

WANG Jia-qing¹, LIU Xiao-hui², GUO Ran¹,
LIDai-zong¹, WANG Zhi-ping^{1,3}, ZHANG Hui¹

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

Abstract: Translocon-associated protein delta (TRAPD) plays a crucial role in physiological processes such as the recognition of signal sequence, the modification of nascent peptide and the formation of translocation channels. RT-PCR and RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) methods were used for the isolation of the whole cDNA of *trapd* gene (GenBank accession number: FJ591154) from rainbow trout. Sequence analysis revealed a 949 bp cDNA containing the 109 bp 5' - UTR, 336 bp 3' - UTR and 504 bp ORF encoding 167 amino acids with a transmembrane region. The sequence alignment between rainbow trout and zebrafish, fugu, salmon, catfish, frog, human and mouse exhibited about 80% identity rate of amino acid. The result indicated the *trapd* gene is highly conservative in the progress of evolution.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*; *trapd* gene; RT-PCR; RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

收稿日期: 2009 - 03 - 27 修回日期: 2009 - 05 - 12

基金项目: 河北省科技厅资助项目 (0624240011)

作者简介: 王家庆 (1981 -), 男, 讲师, 主要从事海洋动物分子生物学及生物信息学研究, E-mail: jiaqing5212@163.com。

虹鳟鱼隶属鲑形目, 鲑科, 鳟属, 俗称鳟鱼, 目前虹鳟的养殖已遍布世界各地^[1]。该鱼属冷水性鱼类, 具有肉味鲜美、食用价值高、生长迅速、饲料利用率高、人工繁殖简便易行等优点, 已成为联合国粮农组织向世界推广的产量高且品质优良的四大淡水养殖品种之一。

易位子相关蛋白 (translocon associated protein, TRAP) 属于内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 膜蛋白, 在新生多肽的共翻译与转运、信号序列的识别、新生肽链的修饰、转运通道的形成等生理过程中发挥重要作用^[2-4]。TRAP是高等真核生物中普遍存在的一类膜蛋白, 它以四聚体的形式存在于 ER 膜上, 分子大小约 100 ~ 150 kD, 由 4 个亚基 (TRAP、TRAP、TRAP 和 TRAP) 组成, 它们均为跨膜蛋白, 其中 TRAP、TRAP、TRAP 亚基跨膜各 1 次, TRAP 亚基跨膜 4 次^[5]。

易位子相关蛋白 (TRAP) 是由 Wiedmann 等^[6]发现的, 由于其能够识别信号序列, 又被称为信号序列受体 (signal sequence receptor, SSR), 它最早是通过光致交联实验发现的, 它们在脊椎动物中是高度保守的^[7]。许多动物的 TRAP 的 4 个亚基基因已经被克隆^[2,8,9], 但 TRAP 在内质网膜上的具体转运功能仍然不是十分清楚^[10]。而且越来越多的证据表明, TRAP 与机体某些疾病的发生有密切联系^[8,11]。

本研究克隆了虹鳟易位子相关蛋白 基因 (*trapd* 或称为 SSR4) 的 cDNA 全长序列, 分析其蛋白序列的细胞定位和功能位点, 构建了聚类树, 分析在物种间的同源性, 为进一步研究鱼类内质网膜蛋白在参与信号序列的识别、新生肽链的修饰、转运通道的形成等生理过程奠定重要理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

虹鳟鱼购自海产品集贸市场, 运回后立即进行脑总 RNA 抽提。

1.2 试剂

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

1.3 总 RNA 的提取

取虹鳟脑组织, 采用 Trizol Reagent 试剂盒, 按说明书提取总 RNA, 用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.4 引物合成

从 NCB 的 GenBank 数据库中下载几种动物 *trapd* 基因的编码序列, 大西洋鲑 (*Salmo salar*, AC168230)、黑青斑河豚 (*Tetraodon nigroviridis*, CAG07447)、斑马鱼 (*Danio rerio*, AAH71553)、斑点叉尾鮰 (*Ictalurus punctatus*, ABC75558)、热带爪蟾 (*Xenopus tropicalis*, AA166953), 根据序列保守性, 设计基因保守区的 RT - PCR 引物 P1 - F 和 P1 - R, 序列如下:

P1 - F: 5' - ATCAACCA TGA TGACCA GAA TAG - 3';

P1 - R: 5' - GTGTAGTCCTTTATGCCTGGATG - 3'。

1.5 虹鳟 *trapd* 基因全长的 cDNA 克隆

cDNA 的合成按反转录 PCR 扩增 (RT - PCR) 试剂盒说明书步骤进行。获得的 RT - PCR 产物片段, 使用 T 载体克隆法克隆 PCR 产物, 阳性克隆送 Takara 公司测序。测序结果在 NCB I 序列数据库经 BLAST 检索, 确定所克隆序列为虹鳟鱼 *trapd* 基因编码序列。根据对 RT - PCR 片段的序列测定结果, 合成 P2 和 P3 引物, 分别用于克隆 cDNA 的 5 和 3 端的序列, 引物序列如下:

P2: 5' - CCCTGTGA TCTACA TTGACA GAGA - 3';

P3: 5' - TACAGCTCTCTACGCAAGGCCAG - 3'。

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

1.6 虹鳟 *trapd* 基因编码蛋白质 (TRAPD) 基本理化性质分析

在线工具 ExPASy - ProtParam 和 SeqFacts 预测蛋白质的基本理化性质, 利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0> 进行蛋白质序列的跨膜区分析; 利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

进行蛋白质序列的信号肽分析; PSORT II(<http://www.psort.org/>)进行蛋白质的亚细胞定位分析;利用 B lasp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)进行氨基酸序列同源性分析; ClustaX 和 MEGA 3.0 软件以氨基酸序列差异作为遗传距离,分析虹鳟鱼 TRAPD 蛋白序列与其它物种的系统发生关系,构建进化树。

2 结果与分析

2.1 虹鳟 trapd 基因的克隆和序列分析

用 trapd 基因保守区引物 P1 - F 和 P1 - R, 通过 RT - PCR 扩增后获得约 500 bp 的产物 (图 1), 经 T 载体克隆测序后的测序结果经 BLAST 检索序列数据库发现, 该序列包括完整的开放阅读框 (ORF) 并且与大西洋鲑、黑青斑河豚和斑马鱼的

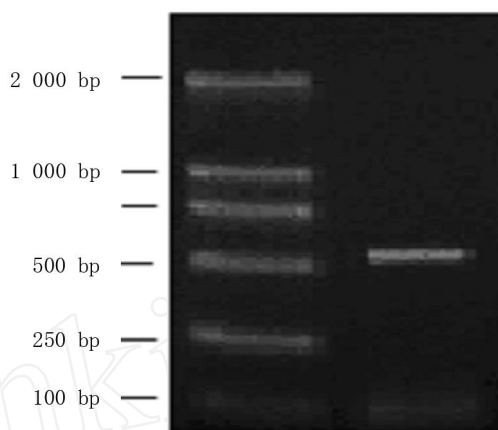


图 1 虹鳟 trapd cDNA 片段

RT - PCR 产物的琼脂糖电泳分析鉴定

Fig 1 Identification of the RT - PCR product of *Oncorhynchus mykiss* trapd cDNA fragment by DNA agrose gel electrophoresis

trapd 基因的同源性分别为 95%、81% 和 78%, 确定该片段为虹鳟 trapd 基因的编码序列。分别利用该序列设计特异的 5' RACE 引物 P2 和 3' RACE 引物 P3, 用于克隆基因的 5 和 3 端序列。经 5 和 3' RACE 分别获得大小均在 500 bp 左右的 PCR 产物, 克隆测序发现, 5 和 3 端序列与虹鳟 trapd 基因编码序列有重叠, 为 trapd 基因 mRNA 的 5 和 3 端序列, 3 个序列经序列组装软件拼接后得到虹鳟 trapd 基因全长 cDNA 序列 (图 2), 提交到 GenBank 获得登录号: FJ591154。

2.2 虹鳟 trapd 基因编码蛋白质 (TRAPD) 理化性质

虹鳟 trapd cDNA 全长 949 bp, 其中 5 端非翻译区 (5' UTR) 长 109 bp, 3 端非翻译区 (3' UTR) 长 336 bp, 开放阅读框长 504 bp, 编码 167 个氨基酸。预测的蛋白质分子量为 18 kD, 理论等电点 (pI) 为 4.88, PSORT II 亚细胞定位显示其位于内质网, Signa IP 预测无信号肽, 通过 TMHMM - 2.0 软件分析可知, 虹鳟 TRAPD 具有 1 个跨膜区, 位于第 140 ~ 159 位氨基酸。SeqFacts 工具显示该蛋白存在 2 个抗原位点, 氨基酸序列分别为: “AAFLALVCLCTGE” (aa6 - 18) 和 “VPTEVMAAL IGLVYYLA FSAKST” (aa141 - 164)。

2.3 TRAPD 蛋白质序列同源性分析

将虹鳟 TRAPD 蛋白与大西洋鲑 (*S. salar*, AC I68230)、黑青斑河豚 (*T. nigroviridis*, CA G07447)、斑马鱼 (*D. rerio*, AA H71553)、斑点叉尾鲷 (*I. punctatus*, ABC75558)、热带爪蟾 (*X. tropicalis*, AA I66953),

```

ACGCGGGGCTGAAAGGGTTTATGAAGGAAGACGCTGCTGTATTGGTGAT 49
ATCTCGAAATAACTAGITCCACAATTCCTTAGTCGIGTTAACACATTTTGATAAAATCAACC 109
ATCATGACCAGAATAGCAGCGTTTCTTGCTCTTGATGCTGTGACGCGGTGAGAGCTGT 169
M M T R I A A F L A L V C L C T G E S C 20
TCAGACCOCTGTGATTACACOCCTCGCCTACACCACCTCTGTATGCCGTCATCTCTCCGAG 229
S D P V I T P S A Y T T S D A V I S S E 40
TCOGTATTCATOGTGGAGCTCAGCCTGGCCTGTGCCAATGGAGCCCAGAGTGTGGCTCTG 289
S V F I V E L S L A C A N G A Q S V A L 60
TATGCTGATGTCAATGGAAGACAGTTCOCCTGTGACTAGAGGOCAGGATGTTGGCAAGTAC 349
Y A D V N G R Q F P V T R G Q D V G K Y 80
CAGGTGTCTGGAGCTGCCCCACAAACAGGCCAGCTCTGGTACATACCAGGTCAAGTTC 409
Q V S W S M P H K Q A S S G T Y Q V K F 100
TTTGATGAGGAGTCTACAGCTCTCTACGCAAGGCCAGAGGAACAATGAGGATGTAGAA 469
F D E E S Y S S L R K A Q R N N E D V E 120
TCCATCCAGCCOCTTTTCTCTGTCAATGTAGATCACAGGGAGCGTGGAAOCGCCOCTGG 529
S I Q P L F S V N V D H R G A W N G P W 140
GTGCTACTGAGGTTATGGCTCTCTCATTTGGCATCCCTGGTGTATTACCTGGCTTTTAGC 589
V P T E V M A A L I G I L V Y Y L A F S 160
GCTAAGAGCACCATCCAGGCAATAAGGACTACACGTCOCCAAGTTCCTTAAGAGCACCAT 649
A K S T I Q A * 167
CCAGGCATAAAGGACTACAOGTCCCAAGGTTCTCTACAACCTGGCTCTCTGAAAAGATTTTT 709
GAATGCTGGTGATTTTTCTAACAACTCAACCTGAGCATACTTTGGCAGAACAACAATAT 769
GCCACCATCCATTTGAGATACGGAAC TAGAACAAATTTGTAATTAATTTTATATTT 829
TCAACGCAGGCTGATTATTTTCGATCAATTCCTAGAACGAAGCCATTGTTTTGTCAACCAA 889
AATAAATGACGTACATCTCAATCGATCCCAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 949

```

图 2 虹鳟 trapd cDNA 及其推导的氨基酸序列

Fig 2 The cDNA and deduced amino acid sequences of the rainbow trout trapd gene

注: *表示终止密码子, 3 端 Poly(A)信号 (AATAAA)用加粗字母表示。

进入凝胶与 DNA 结合,故染色时间更短。在凝胶溶液配制中,我们还加大了过硫酸铵的用量,可使聚合过程产生更多的超氧自由基,加快凝胶聚合速度,这使得在低温环境(如冬季)开展 PAGE 胶分析工作的优点十分突出。在显色液中,我们提高了甲醛的用量,并采用强碱溶液,这样不仅增强了凝胶背景的透明度,提高了读带的准确性,还显著缩短了显带的时间。在银染显带过程中,我们将操作时间缩短到 11 min,比前人报道的方法时间更短。因此,改进方法不仅显著缩短了 PAGE 胶分析时间,还提高了胶的分辨率。

改进的 PAGE 凝胶制备和银染方法,简化了操作程序,缩短了操作时间,比常规方法节约 2 h。在大规模分子标记分析的研究中,改进方法将对提高工作效率起到决定性作用。例如,采用常规方法构建一张包含 100 个 SSR 标记的作物遗传图谱(200 单株的群体),按 1 d 2 块胶计算,加上 PCR 扩增及电泳时间,约需要 1 年时间完成。若采用改进方法,1 d 可完成 6 块胶的分析,半年便可完成框架图谱的构建。此外,改进方法还节省了一些药品(如亲和硅烷、剥离硅烷等),降低了实验成本。目前,根据此方法所进行的黄瓜 SSR 和 SNP 标记的开发及遗传图谱的构建工作已经在我们实验室全面展开。

参考文献:

- [1] 杨安钢,毛积芳,药立波. 生物化学与分子生物学实验技术 [M]. 北京:高等教育出版社,2001.
- [2] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990, 12: 13 - 15.
- [3] 胡建斌,李建吾. 黄瓜基因组 EST - SSR 的分布规律及 EST - SSR 标记开发 [J]. 西北植物学报, 2008, 28 (12): 2 429 - 2 435.
- [4] 蔡仕英,姚志建. 电泳的原理、应用及进展 [J]. 色谱, 1992, 10 (4): 207 - 210.
- [5] 张玉山,白旭峰. 一种简单快速高分辨率的 PAGE 胶显带方法 [J]. 遗传, 2008, 30 (2): 251 - 254.
- [6] 梁宏伟,王长忠,李忠,等. 聚丙烯酰胺凝胶快速、高效银染方法的建立 [J]. 遗传, 2008, 30 (10): 1 379 - 1 382.

(上接第 726)

参考文献:

- [1] Nichols K M, Young W P, Danzmann R G, et al A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Animal Genetics, 2003, 34 (2): 102 - 115.
- [2] Bodescot M, Brison O. Cloning and sequence analysis of the beta subunit of the human translocon - associated protein [J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1 217: 101 - 102.
- [3] Hartmann E, Gorlich D, Kostka S, et al A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum [J]. Eur J Bio Chem, 1993, 214: 375 - 381.
- [4] Rapoport, T A. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane [J]. Science, 1992, 258: 931 - 936.
- [5] Hartmann E, Gorlich D, Kostka S, et al A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum [J]. Eur J Biochem, 1993, 214 (2): 375 - 381.
- [6] Wiedemann M, Kurzchalia T V, Hartmann E, et al A signal sequence receptor in the endoplasmic reticulum membrane [J]. Nature, 1987, 328 (6133): 830 - 833.
- [7] Holthuis J C, Van Riel M C, Martens G J. Translocon - associated protein TRAP and a novel TRAP - like protein are coordinately expressed with pro - opiomelanocortin in xenopus intermediate pituitary [J]. Biochem J, 1995, 312 (1): 205 - 213.
- [8] Wang Z, VandeBerg J L. Cloning and molecular characterization of a human ortholog of Monodelphis TRAPD in ultraviolet B - induced melanoma [J]. Melanoma Res, 2004, 14 (2): 107 - 114.
- [9] Bannis Z, Elena V, Elias K, et al cDNA cloning of the translocon associated protein b - subunit in the chick cerebellum [J]. Gene, 1997, 201: 1 - 4.
- [10] Van den Berg B, Clemons Jr W M, Collinson I, et al X - ray structure of a protein - conducting channel [J]. Nature, 2004, 427: 36 - 44.
- [11] Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, et al NEDL1, a novel ubiquitin - protein isopeptide ligase for dishevelled - 1, targets mutant superoxide dismutase - 1 [J]. J Bio Chem, 2004, 279 (12): 11 327 - 11 335.
- [12] 张成岗,贺福初. 生物信息学方法与实践 [M]. 北京:科学出版社, 2002: 63 - 93.