

文章编号: 1004-7271(2006)04-0385-05

鮰鱼 SCYA 107 基因序列的比较分析

鲍宝龙¹, 李建忠², 李家乐¹, 刘占江^{1, 3}

- (1. 上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090;
2. 嘉兴市鱼种场, 浙江 嘉兴 314016;
3. 奥本大学水产养殖系, 美国阿拉巴马州 36849)

摘要 筛选 BAC 基因组文库得到阳性克隆后, 利用引物步移法测定斑点叉尾鮰 SCYA 107 基因组序列。该基因由四个外显子和三个内含子组成, 外显子拼接的序列与 cDNA 序列完全一致, 编码 96 个氨基酸, 在 N 端含有两个相邻的半胱氨酸 (CC) 和两个不相邻的半胱氨酸, 为典型的 CC 趋化因子亚家族成员, 其上游调控序列有一些与免疫相关的转录因子结合位点, 斑点叉尾鮰 SCYA 107 氨基酸的结构和功能与小鼠趋化因子 CCL 20 比较接近, 而蓝叉尾鮰则更接近人 CCL 8, 它们氨基酸序列的差别是由于斑点叉尾鮰 SCYA 107 基因序列中多了 ACAA 这 5 个核苷酸, 导致读码框移位提前出现终止子 TGA 所造成的。

关键词 斑点叉尾鮰; 蓝叉尾鮰; 趋化因子; SCYA 107

中图分类号 S 917 文献标识码: A

Homologue analysis of chemokine gene SCYA 107 between *Ictalurus punctatus* and *Ictalurus furcatus*

BAO Bao-long¹, LI Jian-zhong², LI Jia-le¹, LIU Zhan-jiang^{1, 3}

- (1. The Key Laboratory Aquatic Genetic Resources and Aquaculture Ecology Certificated by Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;
2. Jiaxing Fishery Farm, Jiaxing 314016, China; 3. Allied Aquacultures and Program of Cell and Molecular Biosciences, Aquatic Genomics Unit, Auburn University, Auburn, AL 36849, USA)

Abstract The positive BAC clones were identified through screening BAC DNA library of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Positive clone 006-113 was partial sequenced using primer-walking stratagem, and 2557 bp-length DNA sequence containing SCYA 107 gene was analysed. SCYA 107 gene consisted of 4 exons and 3 introns. The sequence which spliced into 4 exons was completely same with the SCYA 107 cDNA sequence published before, which encodes 96 amino acids. It is typical one member of chemokine CC subfamily based on owning a CC and two separate cysteines at the N-terminal of amino acid. The upstream of SCYA 126 gene contained some immune-related transcription factor binding sites. There exists a big difference between SCYA 107 proteins of channel catfish and blue catfish. The SCYA 107 protein of channel catfish falls into the scope of mouse chemokine CCL 20, however, the SCYA 107 protein of blue catfish is much closer to human CCL 8. The big difference between the two catfishes results from an insertion with five-bp length of nucleotide ACAA in channel catfish SCYA 107 gene, which leads

收稿日期 2006-02-14

基金项目 上海市教委重点学科项目(Y1101); 农业部'948'项目(2004-Z44)

作者简介 鲍宝龙(1970-), 男, 浙江临海人, 教授, 主要从事分子免疫学和基因组学方面的研究, E-mail: jlbao@shfu.edu.cn

通讯作者: 刘占江, E-mail: liuzhan@auburn.edu

to ORF shift.

Key words : *Ictalurus punctatus* ; *Ictalurus furcatus* ; chemokine ; SCYA 107

斑点叉尾鮰 (*Ictalurus punctatus*) 已成为我国重要的淡水养殖品种。当前,其病害也越来越严重,对其免疫相关因子的鉴定和分析也越来越多^[1,2]。趋化因子是先天免疫的关键组成部分,其能诱导免疫细胞至感染部位^[3-5]。目前在哺乳类中已发现 28 个 CC 趋化因子亚家族的成员^[6]。在条纹狗鱼 (*Triakis scyllia*) 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 等鱼类中有 CC 趋化因子基因的分析报道^[7-10]。在斑点叉尾鮰和蓝叉尾鮰 (*Ictalurus furcatus*) 中,已鉴定出 26 个 CC 趋化因子,分别取名为 SCYA 101 - SCYA 126^[1,2],由于不同物种的 CC 趋化因子氨基酸序列同源性比较低(在 20% ~ 30% 之间),利用氨基酸序列进行同源分析比较困难。斑点叉尾鮰对目前流行的肠败血症的病原菌爱德华氏细菌敏感,而蓝叉尾鮰能抵抗爱德华氏细菌,所以研究此两种鱼免疫因子基因的进化,可以帮助人们鉴定出对爱德华氏细菌抗性的基因。

1 材料和方法

1.1 BAC 基因组文库筛选和 BAC 分离

利用 overgo 杂交探针筛选斑点叉尾鮰 BAC 基因组文库^[11]。筛选文库的过程分为两个步骤:首先把代表斑点叉尾鮰所有 CC 趋化因子家族的 overgo 引物标记,混合后与高密度膜进行杂交,第二步是把阳性克隆从文库中挑选出来后重新点在尼龙膜上,然后用同位素标记的 SCYA107 cDNA 探针进行验证。

25 个代表 CC 趋化因子的 overgo 引物混在一起,在室温下用³²P-dATP 和³²P-dCTP 标记探针。探针变性后加到杂交液(50 mL of 1% BSA, 1 MM EDTA, pH 8.0, 7% SDS, 0.5 mM 磷酸钠, pH 7.2)中,在 54 °C 杂交 18 h。洗涤后的杂交膜压感光片在 -80 °C 放射自显影 2 d,然后显影和定影。

通过 25 个代表斑点叉尾鮰 CC 趋化因子家族的 overgo 探针的杂交,把所有阳性克隆挑选出来重新培养后,点在尼龙膜上。每个克隆分别取 4 μL 过夜培养物点在尼龙膜上,自然干燥。然后通过变性液(0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl)变性 8 min,再分别用中和液(1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.2, 1 mM EDTA)洗 2 次,空气干燥后用紫外交连仪固定 DNA。

cDNA 探针标记采用质粒作模板^[11]。探针标记采用随机引物标记试剂盒(Roche 公司)。尼龙膜先用预杂交液(50% 甲酰胺, 5 × SSC, 0.1% SDS (w/v), 5 × Denhardt's, 100 (g/mL) 鲑精 DNA)预杂交 2 h,然后在加有探针的杂交液(50% 甲酰胺, 5 × SSC, 0.1% SDS (w/v), 100 (g/mL) 鲑精 DNA)中 42 °C 下杂交 16 h 以上。尼龙膜用 2 × SSC 洗 10 min,再用 0.2 × SSC 在 45 °C 下洗 15 min,在 -80 °C 放射自显影 2 d,然后显影和定影。阳性克隆的 DNA 采用 Prep 96 BAC DNA 抽提试剂盒(Qiagen 公司)抽提,具体方法参考厂家的说明书。

1.2 基因组 DNA 序列测定

利用引物步移法直接测序,所用引物参见表 1。在 BAC 直接测序之前,需要用 DyeEx 2.0 Spin 试剂盒(Qiagen 公司)纯化分离的 BAC DNA 作模板,参考 BigDye Terminator v3.0 试剂盒(Applied Biosystems 公司)的说明书进行测序反应,然后用 ABI PRISM 3130XL 自动测序仪分析(Applied Biosystems 公司)。

1.3 序列和结构分析

利用 TFSEARCH 软件预测基因上游序列的转录因子结合位点,采用“脊椎动物”数据库,缺损值为 90。用 Compute pI/Mw tool 软件预测蛋白的等电点和分子量进行。用 GENO3D Release 2 分析蛋白的三级结构。

表 1 引物及其序列

Tab.1 Primers and their sequences

引物名称	序列(5' to 3')	作用
SCYA107A	AGCCAGAAGATCCGAAGCC	006-113 测序引物
SCYA107B	CAGTAGCAAGTCCGTCAGAC	006-113 测序引物
243 - E05ovb	AATCCTGTGATGGCAGCGTGATT	006-113 测序引物和 Overgo 引物
SCYA107E	TGGAAGTGGAGCCGGTTGTCTG	006-113 测序引物
SCYA107K	CTTGTGTATGTGGGTTATGGGTTTC	006-113 测序引物
SCYA107H	TCAACATACGCTTGAACATCTGG	006-113 测序引物
AY55504U	CAGGATTTCAGAGTTCAGCC	006-113 测序引物
AY55504L	GAATCAATTTTCATTTGAGAAAAAATATAATAAA	006-113 测序引物
243 - E05ova	AGGCTTCCACCAAAGAAATCACCG	Overgo 引物

2 结果与讨论

2.1 斑点叉尾鲷 SCYA107 基因组序列的分析

利用 25 个代表 25 CC 趋化因子基因的混合 Overgo 探针,筛选斑点叉尾鲷 BAC 基因组文库,共筛选到 232 个阳性克隆,进一步利用代表 SCYA 107 cDNA 探针进行菌落杂交,共筛选到 8 个阳性克隆,它们分别为 006-113,067-J3,050-J5,090-M4,007-C11,003-N13,184-M14,071-C6。SCYA107 基因组序列包括上游调控序列共 2 557 bp(Genbank 接受号: DQ173281)(图 1)。上游调控序列 770 bp 中和其它免疫因子如 hepcidin,LEAP-2 的基因调控序列一样,通过 TFSEARCH 软件分析发现,同样存在 C/EBP,CdxA,Nkx-2,GATA-3,HSF2,SRY 这些转录因子结合位点^[11,12],表明其在免疫反应中和 hepcidin,LEAP-2 等一样可能同样受这些转录因子的调控,但没有 TATA 框(表 2)。

通过与 SCYA 107 cDNA 序列的比较分析,SCYA 107 基因是由四个外显子和三个内含子组成,第一个外显子长度为 137 bp,第一个内含子长度为 174 bp,第二个外显子长度为 109 bp,第二个内含子长度为 104 bp,第三个外显子长度为 93 bp,第三个内含子长度为 93 bp,第四个外显子长度为 346 bp。外显子和内含子的交接处序列符合典型的 Kozac 规则 GT-AG。基因编码 96 个氨基酸,在 N 端含有两个相邻的半胱氨酸(CC)和两个不相邻的半胱氨酸,这是典型 CC 亚家族趋化因子的特征。去除内含子序列后,其编码区的序列和 SCYA 107 cDNA 序列(Genbank 接受号: BE 470467)一致,另外在第四外显子存在明显的 Poly(A)加尾信号序列 AATAA(图 1)。斑点叉尾鲷 SCYA 107 由四个外显子和三个内含子组成的结构,是目前发现的 CC 趋化因子基因的常见结构^[6]。

2.2 斑点叉尾鲷和蓝叉尾鲷 SCYA 107 氨基酸序列的比较

斑点叉尾鲷 SCYA 107 编码 96 个氨基酸,其等电点 9.91,分子量为 10.855 03 kDa。而蓝叉尾鲷 SCYA 107(Genbank 接受号: AY 555504)编码 119 个氨基酸,其等电点 9.77,分子量为 13.144 42 kDa。氨基酸的序列同源性为 72.3%。通过蛋白质三级结构预测,斑点叉尾鲷 SCYA 107 更接近小鼠的趋化因子 CCL 20,而蓝叉尾鲷 SCYA 107 则更接近人的趋化因子 CCL 8,表明此两种蛋白的结构和功能有比较大的差异。但是,它们的核苷酸序列则非常接近,其氨基酸的序列差异实际上主要表现在斑点叉尾鲷的 SCYA 107 基因序列中插入了 ACAA 这 5 个核苷酸,导致读码框移位提前出现终止子 TGA 造成的,虽然两者的氨基酸的序列或功能可能不相同,但从基因序列上分析,实际上它们是同源基因(图 2)。斑点叉尾鲷和蓝叉尾鲷的亲缘关系是非常接近的,根据目前已鉴定的此两种生物的基因的同源性在 95% 以上^[11]。本文中此两种生物的 SCYA 107 cDNA 的序列同源性也符合这种情况,但由于斑点叉尾鲷 SCYA 107 基因组序列有 5 个核苷酸的插入导致两者的氨基酸序列在 N 端有很大的差异,而且其二级结构和功能也发生了较大的差异,这种功能上的差别是否与抗爱德华氏细菌有关,需今后实验的进一步验证。核苷酸的插入导致氨基酸结构和功能的变化是一种快速进化的有效手段,在今后利用氨基酸序列进行

同源分析时,也应该比较核苷酸的序列的差异。

```

tacgactttttattggcgtacatgtctatcaacttgtaaatcagatctttccgacataacttgaatgcac 70
caatacaatccgatcaccgggacgcacgttaatgcaattgatataccatgtgtgtggtaatgttgcccg 140
atgtcaatgtttctcacgtcattgaatttgtaattataaaagtgtgagatagatagagagaaaatcatt 210
ttccagtgtgggtagaagaggttattgagacacgttattgagaattgtgtgttagtagtgtgtaaaaa 280
aaaaaaaaaatgaaaccgatgacactttacatatagggttcttttggaaatcagcaccttagagttagga 350
aattaaattaaggcatatataagctaggaactgcttcaaaaatcataatacacctttaaatcaactcttt 420
tttttcatcagcaaacgaatcatcttgtaaagagaagtaagatgacattgcctcagtggtttttccta 490
caaaggcaggagactgtcacactacacatgacataggaaaacttgcggtttttatttttccagtaaaatc 560
cccggtgacagacggtggcacacagacacttttgcctcgtgctgctctagtgttaaccacaaaatcactt 630
ggacaggaaagtgtgacaaagagagagatttctccgaaaggaattcccggagggttgaacccctcgtga 700
aagcgtggtcacttctgttttgtaaagtatttaagatgatcacagagcatgaagcaccacaagcgacca 770
CTCGCACCTTCGTTTCAGCTCTGCTTTAGAAAAGGACACGAGGAAAGCTGAGAAACAACCTGCAACATGCCT 840
TTCAGCCAGAAGATCCGAAGCCTCGCTGTCATCGCCGTTCTTGCTGCATCGCGATTACAGTAGCAAGTG 910
CGTCAGACTATTTTGATATTTCAATTGCACCTTCATTATTTAAGAATTGAATGAATCACAATATACTGT 980
ATCATTGTAGTCAGTGTGGTTAATAATGGTTTATATATTGGATTATATCCAGATGTTTCAAGCGTATGT 1050
TGAAATAACCAATCTTTTTTTCCCCCTCAGCTGAGATAGAGACTGTGTGCTGCAGGCAGGTATACCCA 1120
AAGAAATCACCGTGCCCATCACAGGATTACAGAGTTCAGCGTCCACAACCTCCATGTGTCAAAGCAGTCAT 1190
GTAAGCAATCTTAAACAGACTAAACAGACATACAGATGTATCATCTCTTAAACCTGCATATGCATTCTCTC 1260
TCACTCACTCGTCTAAACTTGTCTTCTGCAGCTTTTACACATCCACGGGTCTGTATGCAGCCACTG 1330
GAAGGAACAATGGGTCTTAAAGGAAGGTACGGAGCTCAGGAAACTCAGAGCAAAGTGTAAAGTTCTTTAA 1400
TACTAAACACTTAGAATGTTATTTTGCATGTTTTTTTTTTTTTAAACATTAATGTGAATGTTTTGTGATC 1470
TCTCTCACAGGAAAAACAAACCTGACGATGAAAACACGACAATCGCACCCAGACAACCGGCTCCACT 1540
TCCAGCTTCAATACTACTTTGAACAATTAAGCAATATTTTCTGTGTATGTGGGTATGGGTTCCTCCCT 1610
CCCCCTGTTAATTTATTTTCAATTAATTGATCCATTTGGAAGACCTTATATATATAATTTTTTCTC 1680
AAATGAAATTGATTCTTTTCAAATGTATGCAATCATAATTTAATTTCAAACAGATGTTTACACTCTT 1750
TTGAAATGGTTAATTCATCAATTTGGAAGAATGTGACTTGGATGTGTATGCATAAATAAAAGTTCTTT 1820
TACAGTaccgatttgtacaggttagtatttttcttcttaaggttacagttgaattaaatttgcgaaat 1890
gaacaaatagtcaaatcttgatgtcaagtttgaaggcagaaaggtagaagaaattctagaacagtgat 1960
caccacacctgttctcggagctgtaccttagctccaaccataatcgtagccacctgaccaacactgtct 2030
taaggagttcttgatcaactaaaagaggtgtgttagattttggtttggagatgaagcctgaaggaaggt 2100
gatctcaaggagggtggtgaccactggtctagaacataaataaaccttggtagacatggaaaatatac 2170
aggaaccatgaattgaagtgaataacaagtgctaattagattacaacatgactcaggtgagcgtgatta 2240
aggtgatgtgccaggatgatggaaaatgtagttctgacacagctttnagcgtgatctgacacctgacat 2310
aatttatttatattatggatttattaaatTTTTgtattcatggcgaatttcattagctatgtaagaaaac 2380
gtcttcogagtgttacctatgatagctgcatcatggatttgctacaaaatggacatgtgactacatccaca 2450
aaagagcaacgtgatccagtttcttaagccttctcctcactagttttatttgaaaaataaaaataaat 2520
aaattatactccctattgatttccctaaatcatctga 2557

```

图 1 斑点叉尾鮰 SCYA 107 基因组序列

Fig. 1 The genomic sequence containing SCYA 107 gene of *Ictalurus punctatus*

大写字母为 SCYA107 基因序列;方框表示为转录起始点;翻译起始点和终止子用下划线表示;内含子用黑斜体表示;Poly (A) 加尾信号序列 AATAA 用黑体下划线表示。

表 2 SCYA 107 基因上游序列的转录因子结合位点

Tab.2 Putative transcription factor binding sites within the upstream sequences of the channel catfish SCYA 107 gene

转录因子(Transcription factor)	位置(position)
AML-1a	124-129,
C/EBP	122-134,
CdxA	173-179,166-172,730-736,
Nkx-2	177-184,
GATA-3	190-199,
HSF2	436-445,
SRY	488-494,

I		
ATGCCTTTAGCCAGAAAGATCCGAAGCCTCGCTGTATCGCCGTTCTTGCCCTGCATCGCGATTACAGTAG	70	
M P F S Q K I R S L A V I A V L A C I A I T V	23	
CAACTGAGATAGAGACTGTGTGCTGCAGGCAGGTTATCACCAAAGAAATCACCGTGCCCATCACAGGATT	140	
A T E I E T V <u>C C</u> R Q V I T K E I T V P I T G F	47	
CAGAGTTCAGCGTCCACAACCTCCATGTGTCAAAGCAGTCATCTTTTACACATCCACGGGTCCTGTATGC	210	
R V Q R P Q P P <u>C</u> V K A V I F Y T S T G P V <u>C</u>	70	
AGCCACTGGAAGGAACAATGGGTCTTAAGGAAGGTCACGGAGCTCAGGAACTTCAGAGCAAAGTGAAAA	280	
S H W K E Q W V L R K V T E L R K L Q S K V K K	94	
A <u>CAAAA</u> CCTGACGATGAAAACCTACGACAATCGCACCCGAGACAACCGGCTCCACTTCAGCTTCAATACT	350	
Q T -	97	
ACTTTGAACAATTAA	365	
II		
ATGCCTTTAGCCAGAAAGATCCGAAGCCTCGCTGTATCGCCGTTCTTGCCCTGCATCGCGATTACAGTAG	70	
M P F S Q K I R S L A V I A V L A C I A I T V	23	
CAACTGAGAAAGAGTCTGTGTGCTGCAGGCAGGCTTCCACCAAAGAAATCACCGTGCCCATCACAGGATT	140	
A T E K E S V <u>C C</u> R Q A S T K E I T V P I T G F	47	
CAGAGTTCAGCTCCACAACCTCCATGTGTCAAAGCAGTCATCTTTTACACATCCACGGGTCCTGTATGC	210	
R V Q P P P Q P P <u>C</u> V K A V I F Y T S T G P V <u>C</u>	70	
AGCCACTGGAAGGAACAATGGGTCTGAAGAAGGTCACCGAGCTCAGGAACTTCAGAGCAGAGTAAAAA	280	
S H W K E Q W V M K K V T E L R K L Q S R V K N	94	
ACCTGACGATGAACACTACGACAATCGTACCCAGACAACCGGCTCCACTTCAGCTTCAATACTACTTT	350	
L T M N T T T I V P Q T T G S T S S F N T T L	1 17	
GAACAATTAA	360	
N N -	1 20	

图2 斑点叉尾鲟和蓝叉尾鲟 SCYA 107 核苷酸序列和氨基酸序列的比较

Fig.2 Homologue analysis of SCYA 107 cDNA and amino acid sequences

I 斑点叉尾鲟 SCYA 107 序列; II 蓝叉尾鲟 SCYA 107 序列。两者之间不同的氨基酸残基用黑体表示, 半胱氨酸(C)用下划线表示。

参考文献:

- [1] He C, Peatman E, Baoprasertkul P, *et al.* Multiple CC chemokines in channel catfish and blue catfish as revealed by analysis of expressed sequence tags[J]. *Immunogenetics*, 2004, 56: 379-387.
- [2] Peatman E, Bao B, Baoprasertkul P, *et al.* *In silico* identification and expression analysis of 12 novel CC chemokines in catfish[J]. *Immunogenetics*, 2005, 57: 409-419.
- [3] Neville L F, Mathiak G, Bagasra O. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1997, 8: 207-219.
- [4] Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2: 123-128.
- [5] Laing K J, Secombes C J. Chemokines[J]. *Dev Comp Immunol*, 2004a, 28: 443-460.
- [6] Bacon K, Baggolini M, Broxmeyer H, *et al.* Chemokine/chemokine receptor nomenclature[J]. *Cytokine*, 2003, 21: 48-49.
- [7] Inoue Y, Saito T, Endo M, *et al.* Molecular cloning and preliminary expression analysis of banded dogfish (*Triakis scyllia*) CC chemokine cDNAs by use of suppression subtractive hybridization[J]. *Immunogenetics*, 2005, 56: 722-734.
- [8] Khattiya R, Ohira T, Hirono I, *et al.* Identification of a novel Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) CC chemokine gene and an analysis of its function[J]. *Immunogenetics*, 2004, 55: 763-769.
- [9] Dixon B, Shum B, Adams E J, *et al.* CK-1, a putative chemokine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Immunol Rev*, 1998, 166: 341-348.
- [10] Laing K J, Secombes C J. Trout CC chemokines: comparison of their sequences and expression patterns[J]. *Mol Immunol*, 2004b, 41: 793-808.
- [11] Bao B, Peatman E, Li P, *et al.* Catfish hepcidin gene is expressed in a wide range of tissues and exhibits tissue-specific upregulation after bacterial infection[J]. *Development and Comparative Immunology*, 2005, 29: 939-950.
- [12] Bao B, Peatman E, Xu P, *et al.* The catfish liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene is expressed in a wide range of tissues and developmentally regulated[J]. *Molecular Immunology*, 2006, 43(4): 367-377.