

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2018.06.005

## 单环刺螭泛素基因的克隆及表达\*

张立涛 崔巍 陈茜 毕愿坤

(济宁医学院生物科学学院,日照 276826)

**摘要 目的** 以单环刺螭为研究对象,克隆其泛素基因并分析其器官表达规律,为其功能的进一步研究提供理论依据。**方法** 采用 BLAST 方法在单环刺螭转录组中获得泛素基因序列,设计引物扩增其开放阅读框(open reading frame, ORF)并经测序对其进行验证,随后对序列进行多序列比对和进化分析,进一步确定序列的准确性,最后采用 qRT-PCR 方法对泛素基因在单环刺螭各器官的表达规律进行分析。**结果** 克隆获得单环刺螭泛素基因,其 ORF 为 234 bp,编码 76 个氨基酸,氨基酸序列与其他物种的泛素极其相似。单环刺螭泛素基因在体腔液中表达量最低,在后肠和中肠的表达量是体腔液表达量的 2.39 倍和 2.78 倍,体壁的表达量是体腔液表达量的 3.46 倍,而肛门囊表达量达到体腔液表达量的 4.55 倍。**结论** 本研究成功克隆获得单环刺螭泛素基因,其在单环刺螭各器官的表达规律:体腔液 < 肠道 < 体壁 < 肛门囊。

**关键词** 单环刺螭;泛素;表达规律

中图分类号:Q178.53 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2018)12-396-04

## The clone and expression analysis of ubiquitin gene in the Urechis unicinctus

ZHANG Litao, CUI Wei, CHEN Qian, BI Yuankun

(College of Biological Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

**Abstract: Objective** Urechis unicinctus was chosen as the objective of study and then we cloned the ubiquitin gene and obtained its organ expression characteristics, which can offer the theoretical foundation for further research of ubiquitin function. **Methods** The sequence of the ubiquitin was obtained from the transcriptome of the U. unicinctus by BLAST. Afterwards, its ORF was amplified by the designed primers and verified by sequencing. For further validation, multiple sequence alignment and evolutionary analysis was conducted. Finally, qRT-PCR was used to obtain organ expression characteristics of ubiquitin gene. **Results** We cloned the ubiquitin gene with the ORF of 234 bp coding 76 amino acids from U. unicinctus. The ubiquitin sequence of U. unicinctus shared high similarity with other species. The ubiquitin expression was the lowest in the coelomic fluid, followed by the midgut (2.39 fold) and hindgut (2.78 fold), the body wall (3.46 fold), and the highest in the anal sac (4.55 fold). **Conclusion** In the study, the ubiquitin gene was successfully cloned from U. unicinctus and its expression feature in different organs was displayed: coelomic fluid < intestine < body wall < anal sacs.

**Keywords:** Urechis unicinctus; Ubiquitin; Expression characteristics

在体内维持蛋白质稳态平衡对于生物体来说至关重要,而该平衡的维持主要依靠泛素蛋白酶系统<sup>[1]</sup>以及自噬-内溶酶体系统<sup>[2]</sup>。在泛素蛋白酶系统中,泛素通过泛素激活酶、结合酶和连接酶的作用结合到蛋白质底物上,作为蛋白降解的标志被

28S 蛋白酶复合体所识别启动蛋白质的降解<sup>[1]</sup>。除了参与蛋白降解外,泛素化修饰也是生物体蛋白质翻译后修饰的一种重要形式,几乎在所有功能细胞内部发挥着重要的作用,这些作用包括蛋白质降解, DNA 损伤反应, 应激和细胞内信号转导等<sup>[3]</sup>。

泛素最初是从牛胸腺中分离出来,随后发现泛素高度保守,普遍存在于从原生动到脊椎动物的活细胞中,由分子量为 8.4 ~ 8.5kDa 的 74 ~ 76 个

\* [基金项目] 山东省基金联合专项(ZR2016CL17); 济宁医学院博士基金(JY2015BS15)

氨基酸残基组成<sup>[4]</sup>。泛素研究主要集中于高等动植物体内,但是对于海洋无脊椎动物的研究较少,目前仅在拟穴青蟹<sup>[5]</sup>、太平洋牡蛎<sup>[6]</sup>等物种中有所报道。单环刺螠属于螠虫动物门,螠纲,无管螠目,刺螠属,是居住在潮间带和潮下带 U 型洞穴的海洋无脊椎生物,也是无管螠目在我国存在的唯一物种<sup>[7]</sup>。本文以单环刺螠为研究对象,克隆单环刺螠泛素基因,分析其结构特征及其器官分布规律,为单环刺螠泛素基因功能的进一步研究提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 动物** 单环刺螠购买于山东省日照市石臼水产市场,产地为烟台近海潮间带,于实验室内通气人工海水(18℃、pH 7.8 和盐度 26)不投饵暂养。

**1.1.2 取样** 暂养 3 天后,挑取 6 只个体对体壁、肛门囊、中肠、后肠和体腔液进行取样,液氮冻存, -80℃ 长期保存。

**1.1.3 仪器及试剂** 试剂主要为 Trizol(上海生工)、乙醇(国药集团)、氯仿(国药集团)、异丙醇(国药集团)、琼脂糖(上海生工)、Golden View(Solarbio)、cDNA 反转录试剂盒 Primescript RT reagent Kit With gDNA Eraser(Takara)和荧光定量试剂盒 TB Green Premix Ex Taq(Takara),引物由上海生工公司合成。

仪器主要为 PCR 仪(Biorad S100)、电泳仪(北京六一)、凝胶成像(Biorad GelDoc XR)和荧光定量 PCR 仪(Biorad CFX Connect)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 RNA 提取及 cDNA 合成** 采用 Trizol 法提取单环刺螠器官 mRNA,将 0.1 g 组织加入 1ml Trizol 溶液中,电动匀浆器匀浆,根据 Trizol 说明书的步骤提取 RNA,1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测质量。随后根据 Takara 反转录试剂盒 Primescript RT Reagent Kit with gDNA Eraser(Takara)说明书的流程反转录 RNA,获得 cDNA。

**1.2.2 单环刺螠泛素基因的克隆及分析** 利用太平洋牡蛎泛素基因(注册号:JQ030888)在单环刺螠转录组(注册号:SRA122323)中进行 BLAST 搜索,获得单环刺螠泛素的相似序列,随后利用开放阅读框(open reading frame, ORF)finder 确定序列

的 ORF,设计 ORF 验证引物(表 1)进行 PCR,模板 1μl,2 × PCR Mix 5μl(上海生工),正向引物(2μM)4μl,反向引物(2μM)4μl,水 6μl,总体积为 20μl。混匀离心后,行 PCR 扩增,96℃ 预变性 10 min;96℃ 30s,45℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,35 个循环;72℃ 延伸 5min。随后对 PCR 产物测序验证。确定后利用 NCBI 查找其他物种泛素基因序列,利用 CLUSTAL X2 对其进行多序列比对,获得其保守序列;利用 MEGA 7 软件采用邻位相连法对其进行进化分析。

**1.2.3 单环刺螠泛素基因表达分析** 利用 qRT-PCR 对单环刺螠泛素基因在各个器官中的表达分布规律进行分析。将反转录的 cDNA 模板利用 TB Green™ Premix Ex Taq™ 试剂盒(Takara)行在进行 qRT-PCR 检测,2 × TB Green Premix Ex Taq 10μl、正、反向引物(2mM)各 4μl,模板 2μl。反应程序为 95℃ 预变性 10min;95℃ 变性 15s,60℃ 退火延伸 1min,40 个循环;随后进行溶解曲线反应验证产物扩增的特异性。β-actin 作为内参基因,2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法来确定目的基因的相对表达。引物见表 1。

表 1 PCR 引物序列

引物	序列	作用
Ub ORF-F	5'-GAATTCATGCAGATCTTTGCAAG-3'	ORF 验证
Ub ORF-R	5'-AAGCTTTTACAGACCACCTCG-3'	
Ub-F	5'-CAAGACCCCTGACTGGCAAGA-3'	荧光定量 PCR
Ub-R	5'-TGTTGTAGTCGCTCAATGTGC-3'	
β-actin-F	5'-CACACTGTCCCATCTACGAGG-3'	荧光定量 PCR
β-actin-R	5'-GTCACGGACGATTACACGCTC-3'	内参

### 1.3 统计 学方法

所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,利用 SPSS 18.0 统计分析软件进行数据分析。

## 2 结 果

### 2.1 单环刺螠泛素基因的克隆

利用已知的与单环刺螠在进化上关系最近的太平洋牡蛎泛素基因在单环刺螠转录组中进行 BLAST 获得单环刺螠泛素序列,全长 500 bp,利用 ORF Finder 发现其 ORF 在 37~270 位点,长度 234 bp,利用设计的 ORF 引物(表 1)行 PCR 验证,其电泳结果如图 1 所示,PCR 后获得单一条带,大小在 250 bp 左右,与预测大小基本一致,测序公司测序确定结果与转录组结果一致。

其序列特征如图 2 所示,序列全长 500 bp,

ORF 长度 234 bp, 编码 76 个氨基酸, 分子式 C382H638N106O119S1, 含有 1246 个原子, 相对分子质量为 8651.97, 等电点是 6.56。

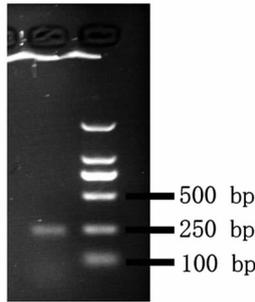


图 1 单环刺螭泛素 ORF 验证

### 2.2 单环刺螭泛素基因序列保守性及进化分析

利用多序列比对分析发现,单环刺螭的泛素基因序列与其他物种的泛素基因具有高度的一致性,



图 3 泛素序列比对分析图

仅仅只有 C 端的一个氨基酸序列不同(图 3)。根据其多序列比对结果利用 MEGA7.0 构建进化树,单环刺螭与无脊椎动物聚为一枝,再与高等脊椎动物聚为一枝,与进化关系基本保持一致。见图 4。

```

1          M Q I
1 tccactctccacttggtgctccgctgaggtggcATGCAGATC
4 F V K T L T G K T I T L E V E
46 TTTGTCAAGACCTGACTGGCAAGACCATCACCTTGAGGTGCGAG
19 A S D T I E N V K A K I Q D K
91 GCTTCTGACACTATCGAGAATGTCAAGCCAAGATCCAGGACAAG
34 E G I P P D Q Q R L I F A G K
136 GAAGGTATTCTCCAGATCAGCAGCGTCTCATCTTCGCTGGCAAG
49 Q L E D G R T L S D Y N I Q K
181 CAGTTGGAGGACGGCCGCACATTGAGCGACTACAACATCCAAAAA
64 E S T L H L V L R L R L R G G L *
226 GAGTCCACTTTCACCTGGTGTCCGCTCGCAGGTGGTCTGTAA
271 ccagtcactactatgataatgtagtgaccccaatgaagaagaag
316 tataaacaatcttttggcctgttttcttgaattatcctt
361 tcgtattgcaatatacaaggttgagtcataaacgttttaagtgt
406 tattccattactatctgttcattcctaacaatgtagctttcgaa
451 tcactggaactatcctgcatcttttactggaataaagttgagagta
496 ccaag

```

图 2 单环刺螭泛素基因及其推导的氨基酸序列

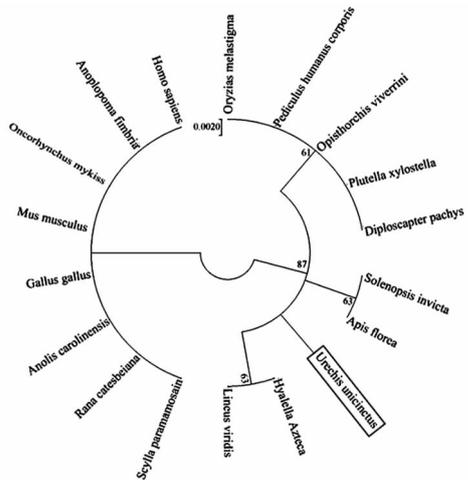
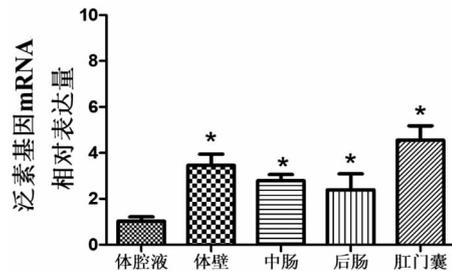


图 4 泛素进化分析

### 2.3 单环刺螭泛素基因在各器官中表达特征

分析单环刺螭泛素基因在单环刺螭各个器官

中的表达规律,体腔液中表达量最低,其次是肠道,后肠的表达量是体腔液的 2.39 倍,中肠是 2.78 倍,然后是体壁,表达量是体腔液表达量的 3.46 倍,而肛门囊表达量最高,达到体腔液表达量的 4.55 倍。除体腔液外,其他器官中泛素基因的相对表达量无统计学差异( $P > 0.05$ )。见图 5。



注:与体腔液泛素基因 mRNA 相比, \*  $P < 0.05$ 。

图 5 单环刺螭泛素基因在单环刺螭各器官分布规律( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

### 3 讨论

泛素蛋白质酶系统一直是生物科学的研究热点之一,泛素蛋白与目标蛋白的共价结合介导蛋白的选择性降解是泛素参与的经典途径,这一途径广泛存在于真核生物中<sup>[8]</sup>。因此,为了维持功能的稳定,泛素基因序列从高等无脊椎动物到低等的真菌具有高度的保守性,例如人和酵母的泛素基因仅有 3 个氨基酸残基的差别<sup>[9]</sup>。本研究克隆得到的单环刺螠泛素基因蛋白质序列与其他物种的序列也具有极高的保守性,仅仅在 C 端存在着一个氨基酸的不同,这些结果进一步说明泛素基因在生物进化过程中具有相同的祖先,而且进化过程中为了维持功能的稳定,序列几乎不发生变异,从另外角度也证明了其功能的重要性。

单环刺螠泛素基因在各器官中广泛存在,而且除体腔液外在其他器官中的表达量无统计学差异,这一结果恰好与泛素基因的名字在各组织中广泛存在相对应,这也与拟穴青蟹中泛素在各器官中的分布规律一致<sup>[5]</sup>。但是泛素基因在精卵发生过程中发挥着重要作用,其表达量会出现显著性的变化,例如在小鼠精原细胞中含量很低,精母细胞含量开始升高,到达精子表达量最高<sup>[10]</sup>。对于单环刺螠来说,其体腔液中会存在大量生殖细胞<sup>[11-12]</sup>,这会导致泛素基因的相对表达量改变。此外,泛素参与的非经典途径参与多种生理生化反应,在低等的海洋无脊椎动物中,泛素具有抗菌的特性<sup>[6]</sup>,单环刺螠泛素的功能需要进一步的研究。

#### 参考文献:

[1] Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway [J]. Cell, 1994, 79 (1): 13-21. DOI: 10. 1016/0092-8674(94)90396-4.  
 [2] Pillay CS, Elliott E, Dennison C. Endolysosomal proteolysis and its regulation [J]. Biochemical Journal, 2003,

363(3):417-429. DOI:10. 1042/bj3630417.  
 [3] 张宏,杜亚琼,李凤良,等.小菜蛾泛素基因的克隆与分析[J].南京师大学报(自然科学版),2013,36(3):116-119. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-4616. 2013. 03. 022.  
 [4] Schlesinger D H, Goldstein G. Molecular conservation of 74 amino acid sequence of ubiquitin between cattle and man [J]. Nature, 1975, 255 (5507): 423-424. DOI: 10. 1038/255423a0.  
 [5] 戴燕彬,韩坤煌,颜素芬,等.拟穴青蟹泛素基因的克隆及其在性腺发育过程中的表达[J].中国水产科学,2012(6):946-955. DOI: 10. 3724/SP. J. 1118. 2012. 00946.  
 [6] Seo JK, Min JL, Go HJ, et al. Purification and antimicrobial function of ubiquitin isolated from the gill of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Molecular Immunology, 2013, 53 (1-2): 88-98. DOI: 10. 1016/j. molimm. 2012. 07. 003.  
 [7] 刘峰,孙涛,纪元,等.单环刺螠生物学及生态学研究进展[J].海洋科学,2017,41(10):125-131. DOI: 10. 11759/hyxx20170414001.  
 [8] 黄新敏,张艳霞,万小荣.泛素蛋白的研究进展[J].广东农业科学,2010,37(6):191-194. DOI: 10. 3969/j. issn. 1004-874X. 2010. 06. 079.  
 [9] 王金昌,李燕萍.泛素-蛋白酶体途径的生物学功能[J].江西科学,2006,24(2):54-57,85. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-3679. 2006. 02. 016.  
 [10] 于晖,王永潮,费仁仁,等.小鼠精子发生过程中泛素的表达[J].发育与生殖生物学学报(英文版),2001(S1):32.  
 [11] 王航宁,邵明瑜,张志峰.单环刺螠精巢年周期发育及精子发生[J].中国水产科学,2011,18(5):1189-1195. DOI: 10. 3724/SP. J. 1118. 2011. 01189.  
 [12] 李昀,王航宁,邵明瑜,等.单环刺螠生殖腺的发生及雌体的生殖周期[J].中国海洋大学学报(自然科学版),2012,42(6):85-88. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5174. 2012. 06. 013.

(收稿日期 2018-10-09)  
 (本文编辑:石俊强)

(上接第 395 页)

[10] Middel P, Reich K, Polzien F, et al. Interleukin 16 expression and phenotype of interleukin 16 producing cells in Crohn's disease [J]. Gut, 2001, 49 (6): 795-803. DOI: 10. 1136/gut. 49. 6. 795.  
 [11] Kontaki E, Boumpas DT, Tzardi M, et al. Aberrant function of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in ex-

perimental colitis and in inflammatory bowel disease (IBD) immune responses [J]. Autoimmunity, 2017, 50 (3): 170-181. DOI: 10. 1080/08916934. 2017. 1283405.

(收稿日期 2018-05-30)  
 (本文编辑:石俊强)