论著

文章编号:1000-5404(2007)04-0318-03

四川黑熊NADH脱氢酶亚基4基因的序列分析

陈 瑜,侯万儒,吴 夏,彭正松,周才权 (西华师范大学生命科学学院遗传学实验室,南充 637002)

提 要:目的 探讨黑熊线粒体ND4基因的序列特点。**方法** 根据已报道的若干物种的NADH脱氢酶亚基4基因(ND4)设计引物。运用PCR技术从四川黑熊毛囊组织的总DNA中扩增出ND4基因。并对ND4基因进行分析。**结果** PCR扩增所得DNA序列长度为1 402 bp,该序列包含了ND4基因,其ORF为1 377 bp,编码459个氨基酸,编码蛋白的分子量为51.5×10^3,pI为9.37。四川黑熊的ND4基因序列及其所编码的氨基酸序列与美洲黑熊、马来熊、棕熊、北极熊、人、大鼠、小鼠和狗等其他哺乳动物的ND4基因序列和对应的氨基酸序列具有较高的相似性,分别为68%~91%和71%~95%。拓扑结构预测显示四川黑熊ND4基因的蛋白质上分别存在N-糖基化位点、蛋白激酶C磷酸化位点、酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点、N-酰基化位点、亮氨酸拉链以及富含亮氨酸的区域。**结论** 哺乳类动物的ND4基因具较高的保守性,而其所编码的蛋白在功能上具有高度的一致性。

关键词: 四川黑熊;线粒体;ND4基因;分析;进化树;构建

中图法分类号: Q343.3;Q781;Q959.838 **文献标识码:** A

Sequence analysis of mtDNA NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4 gene of Asian black bear Sichuan subspecies

CHEN Yu, HOU Wan-ru, WU Xia, PENG Zheng-song, ZHOU Cai-quan (College of Life Science, China West Normal University, Nanchong 637002, China)

Abstract: Objective To investigate the sequence characteristic of black bear's mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4 gene (ND4). **Methods** Primers were designed according to certain species' NADH-ubiquinone oxidoreductase ND4 in which the DNA sequence had been reported. The DNA sequence was amplified by PCR from the Asian black bear Sichuan subspecies's (*Ursus thibetanus mupinensis*) hair-follicle tissue total DNA and were analyzed with its amino acid sequence. **Results** The ND4 gene sequence length was 1 402 bp and contained a 1 377-nucleotide open reading frame encoding 459 amino acid residues. The amino acid sequence's pI was 9.37 and weight was 51.5×10^3. The DNA sequence and corresponding amino acid sequence of black bear's ND4 gene had the high similarity with those of other mammalian animals' ND4 gene, and the similarity was 89% to 91% and 94% to 95%. The result of phylogenetic tree was basically consistent with the traditional species system phylogenetic relations. Topology prediction showed the Asian black bear Sichuan subspecies's ND4 proteins contained N-glycosylation site, kinase C phosphorylation sites, casein kinase Ⅱ phosphorylation site, N-myristoylation site and leucine-rich region. In addition, black bear's ND4 protein contained leucine zipper pattern and Leucine-rich region. **Conclusion** The mammalia animal's ND4 gene has the high conservative nature. The pretein coded by ND4 gene has high uniformity in the function.

Key words: Asian black bear Sichuan subspecies; mitochondrion; ND4 gene; analysis; phylogenetic tree; construction

基金项目: 国家自然科学基金(30570275);四川省应用技术项目(2006J13-057);四川省教育厅重点科研项目(2004A101);四川省重点学科建设项目(SZD0420);西华师范大学科研启动项目(2003)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570275), the Applied Technology Project of Sichuan Province (2006J13-057), the Key Scientific Research Foundation of Educational Committee of Sichuan Province (2004A101), the Key Discipline Construction Project of Sichuan Province (SZD0420) and the Scientific Research Foundation of China West Normal University (2003)

作者简介: 陈 瑜(1979-),女,四川省广安市人,硕士研究生,主要从事生物化学和分子生物学方面的研究。电话:(0817)2922008,E-mail: c079082@126.com

通讯作者: 侯万儒,E-mail: HWR168@Yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-03-06;**修回日期:** 2006-11-10

在动物细胞里,80% 以上的能量是在线粒体中合成的。糖和脂肪等营养物质经酵解和三羧酸循环后脱下的氢经线粒体内膜上的电子传递系统即呼吸链,最后传递给氧。呼吸链中的复合物 Ⅰ 即 NADH 脱氢酶(NADH dehydrogenase)是最复杂的酶系,其作用是催化 NADH 的 2 个电子传递至辅酶 Q。四川黑熊(*Ursus thibetnnus mupinensis*)隶属熊科黑熊属。目前,黑熊被列为《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)附录 Ⅰ 物种,国家 2 级重点保护野生动物,《中国濒危动物红皮书》将其列为易危种[1]。对于黑熊的研究主要是集中在种群生态和生化上[2,3]。而开展黑熊线粒体基因组研究,对于揭示黑熊细胞质遗传特点,分析物种多样性,制定基因保护对策,合理利用资源等方面具有重大意义。本研究以四川境内的黑熊为研究对象,运用分子生物学原理与相应的技术手段对线粒体 NADH 脱氢酶亚基 4 基因(ND4)进行研究,旨在填补四川黑熊基因研究的空白。

1　材料与方法

1.1　材料

6 只雌性四川黑熊和 6 只雄性四川黑熊的毛囊组织样品,取自四川省中药材公司都江堰鹿场的圈养黑熊。

1.2　实验方法

1.2.1　组织总 DNA 的提取　　蛋白酶 K 消化、饱和酚—氯仿萃取、乙醇沉淀、TE 溶解。利用 DU640 核酸蛋白分析仪(美国 Beckman 公司生产)测定 DNA 的浓度。各个体的 DNA 样品等量混匀构建基因池。4℃保存备用。

1.2.2　引物设计　　根据 *Helarctos malayanus* 马来熊(GenBank accession No. AY598592)[4], *Ursus americanus* 美洲黑熊(GenBank accession No. AF303109)[5], *Ursus maritimus* 北极熊(GenBank accession No. AF303111)和 *Ursus arctos* 棕熊(GenBank accession No. AF303110)的序列设计引物扩增四川黑熊 ND4 基因的全序列。引物序列为:ND 4-F,5′-AATCTCTTACAATGCTAAAAATTATC-3′和 ND4-R,5′- AAACTATATTTACAGTAAATGGGCCCC-3′。

1.2.3　PCR 扩增反应　　PCR 反应体系 50 μl,含 dNTPs 0.2 mmol/L, $MgCl_2$ 1.5 mmol/L, *Ex Taq* DNA 聚合酶 2.5 U, DNA 200 ng。PCR 扩增程序为:94 ℃预变性 5 min,然后 94 ℃变性 1 min,50 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。

1.2.4　产物的纯化与测序　　1.0% 琼脂糖凝胶检测 PCR 产物,5 V/cm 电泳 30 min ,紫外灯下观察,用 Olympus C-1400L 型数码相机记录结果。并回收、纯化。标准纯化步骤参照胶回收(小量)试剂盒操作手册。纯化后的 PCR 扩增产物在 AB 3700 型测序仪上直接测序。

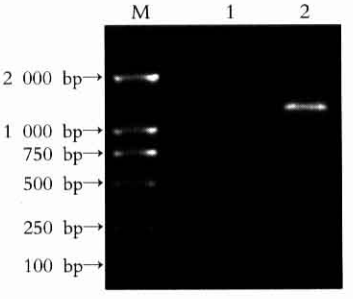
1.3　序列分析

DNA 序列的预测采用软件 GenScan (http: //genes. mit. esu/GENSAN. html)。在 GenBank 中的相似性比较采用 Blast 2.1 软件(http: //www. ncbi. nim. nih. gov/blast)。DNA 序列的 ORF 查找用 ORF finder 软件 (http://www. ncbi. nlm. nih. gov/gorf/gorf. html)。多序列的比较采用 Clustal W 软件(http://ww. ebi. ac. uk/clustalw/)。利用 MEGA 3.1 软件构建序列的 NJ 和 UPGMA 进化树。利用 PredictProtein 软件(http://cubic. bioc. columbia. edu/predictprotein/)对蛋白质进行预测和结构分析。

2　结果

2.1　PCR 产物和测序

以 ND4-F 和 ND4-R 为引物进行 PCR 扩增,所得产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,可见明显特异性扩增条带,在 1 400 bp 左右(图 1)。在 DNA 测序仪上直接测定 PCR 产物,大小为 1 402 bp。



M:分子量标准(DL 2000);1:空白对照;2:黑熊样品

图 1　四川黑熊 ND4 基因的 PCR 扩增结电泳图

2.2　序列分析

在 NCBI 数据库中利用 Blast 搜索软件进行同源性基因检索,结果显示该序列与其他哺乳动物 ND4 的 DNA 序列最为相似,证明所克隆的序列为四川黑熊 ND4 的 DNA 序列,将该序列登录于 GenBank,得到的登录号为 DQ402478。其 ORF 为 1 377 bp,编码 459 个氨基酸,无内含子,起始密码子和终止密码子分别为 ATG 和 UAC。与其他动物的 ND4 相似[4-9]。根据预测的氨基酸序列,进一步分析出四川黑熊 ND4 基因的蛋白质的分子量为 51.5×10^3,pI 为 9.37,其氨基酸序列有 5 个半胱氨酸残基和 13 个色氨酸残基,以及 13 个带负电荷的氨基酸残基(天冬氨酸和谷氨酸)和 23 个带正电荷的氨基酸残基(精氨酸和赖氨酸)。拓扑结构预测显示四川黑熊 ND4 基因的蛋白质上有 4 个 N-糖基化位点,4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点,3 个酪蛋白激酶 Ⅱ 磷酸化位点,2 个 N-酰基化位点,1 个亮氨酸拉链以及 1 个富含亮氨酸的区域。

2.3　进化树的构建与分析

利用 Mega 3.1 软件的 NJ 和 UPGMA 法构建四川黑熊和其他熊类、人、大鼠、小鼠及狗的分子进化树(图 2)。ND4 基因的进化树与传统的物种系统进化关系基本一致。棕熊和北极熊属同一属,美洲黑熊与四川黑熊关系比与棕熊和北极熊的关系更近,熊类与同为食肉目的狗归为 1 支。

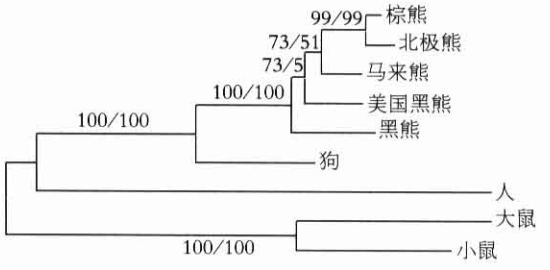


图2 几种动物 ND4 基因氨基酸序列的进化树

3 讨论

ND4 基因是线粒体基因组所编码的、呼吸链复合物Ⅰ的1个亚基。本研究根据已有的哺乳动物序列信息,利用基因序列的保守性设计引物和 PCR 扩增,成功扩增出四川黑熊 ND4 基因。对 ND4 基因的 DNA 序列和所编码的氨基酸序列与马来熊、棕熊、美洲黑熊、北极熊、狗、大小鼠和人的 ND4 基因的 DNA 序列和所编码的氨基酸序列进行相似性比较,发现熊类中四川黑熊与美洲黑熊的相似性最大,分别为 91% 和 95%,其他动物中与狗的相似性最大,分别为 79% 和 89%。其他动物的相似性分别为:棕熊是 89% 和 95%,北极熊是89%和94%,马来熊是91%和95%,人是69%和72%,大鼠是 68% 和 71% 和小鼠是 70% 和 70%。对四川黑熊、马来熊、棕熊、美洲黑熊、北极熊、狗、大小鼠和人的 ND4 基因的氨基酸序列进行了多序列比对分析,结果表明四川黑熊 ND4 基因所编码的氨基酸序列在35、199、276、328、419 位上有 5 个半胱氨酸残基,其中有 2 个(276、328 位)是上述几种动物所共有的。四川黑熊 ND4 氨基酸序列 N 端含有 4 个保守的 N-糖基化位点,分别位于 26、51、138、390 位上,但是人在 51、138 位点,大鼠在 390 位点没有 N-糖基化位点,棕熊和北极熊在 366 位点多了 1 个 N-糖基化位点。四川黑熊 ND4 基因所编码的氨基酸序列还含有其他几个位点,如蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点、N-酰基化位点和亮氨酸拉链,只有美洲黑熊、大小鼠和人没有亮氨酸拉链。此外还含有 1 个富含亮氨酸的区域,这是几种熊才共有的,可能是熊类所特有的。说明 ND4 基因具较高的保守性。

长期以来亚洲黑熊和美洲黑熊的进化关系一直是动物学家们所关注的重要课题。Allen[10] 认为亚洲黑熊除了掌垫比较发达之外,牙齿构造与外部特征,都与美洲的黑熊极相似,因而认为美洲黑熊与亚洲黑熊应属于同一属。一些化石数据也支持将美洲黑熊置于黑熊属[11,12]。但是 Pocock[13] 却极力反对这一看法,他指出美洲黑熊在鉴别特征上与亚洲黑熊有明显的差异,是完全独立的属。现在,绝大多数研究者都同意后一看法。但我们的结果和 A11en 的结果一致,支持将美洲黑熊置于黑熊属。

本研究以四川境内的四川黑熊为研究对象,运用分子生物学原理与相应的技术手段,扩增出线粒体 ND4,为揭示黑熊线粒体遗传特点,分析物种多样性,制定基因保护对策,合理利用资源等方面奠定了基础。

参考文献:

[1] 汪 松. 中国濒危动物红皮书:兽类[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 12.

[2] 侯万儒,李家烈. 黑熊肌酸激酶及其同工酶活性的检测[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(14): 1450-1452.

[3] 侯万儒,宋志平,胡锦矗,等. 黑熊种群年龄结构和生命表初探[J]. 动物学研究, 2000, 21(2): 127-132.

[4] Delisle I, Strobeck C. A phylogeny of the Caniformia (order Carnivora) based on 12 complete protein-coding mitochondrial genes [J]. Mol Phylogenet Evol, 2005, 37 (1): 192-201.

[5] Delisle I, Strobeck C. Conserved primers for rapid sequencing of the complete mitochondrial genome from carnivores, applied to three species of bears [J]. Mol Biol Evol, 2002, 19 (3): 357-361.

[6] Tanaka M, Cabrera V M, Gonzalez A M, *et al*. Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan [J]. Genome Res, 2004, 14 (10A): 1832-1850.

[7] Gadaleta G, Pepe G, De-Candia G, *et al*. The complete nucleotide sequence of the Rattus norvegicus mitochondrial genome: cryptic signals revealed by comparative analysis between vertebrates [J]. J Mol Evol, 1989, 28 (6): 497-516.

[8] Bayona-Bafaluy M P, Acin-Perez R, Mullikin J C, *et al*. Revisiting the mouse mitochondrial DNA sequence [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31 (18): 5349-5355.

[9] Kim K S, Lee S E, Jeong H W, *et al*. The complete nucleotide sequence of the domestic dog (Canis familiaris) mitochondrial genome [J]. Mol Phylogenet Evol, 1998, 10 (2): 210-220.

[10] Allen G M. The mammals of China and Mongolia [M]//Granger W. Natural History of Central Asia. New York: American Museum of Natural History, 1938: 312-489.

[11] THENIUS E. Ursiden phylogenes and biostratigraphie[J]. Z Saugetierk, 1959, 24: 78-84.

[12] Kurten B, Anderson E. Pleistocene Mammals of North America [M]. New York: Columbia University Press, 1980, 442.

[13] Pocock R I. The fauna of British India, including Ceylon and Burma, Mammalia (2vols, Primates and Carnivora only) [M]. London: Taylor and Francis, 1939, 1941: 503.

(编辑 王小寒)