

# 大鳞副泥鳅和泥鳅 *GNB2L1* 基因的克隆、 表达及系统进化分析

徐玲花<sup>①</sup> 严镇钧<sup>②#</sup> 李琼<sup>①</sup> 曹芳<sup>①</sup>

① 湖北理工学院化学与化工学院 黄石 435003; ② 湖北师范学院生命科学院 黄石 435002

**摘要:** 由 G 蛋白  $\beta 2$  亚基类似物 1 基因 (*GNB2L1*) 编码的蛋白激酶 C 受体 (RACK1) 是一个高度保守的锚定蛋白, 属于 WD40 结构域蛋白家族成员, 在细胞信号转导等生命过程中发挥着重要作用。本文采用 RACE 技术和基因克隆技术分别对大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 和泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 精巢组织的 *GNB2L1* 基因 cDNA 序列进行了克隆。序列分析表明, 大鳞副泥鳅 *GNB2L1* 基因 cDNA 序列全长 1 115 bp, 开放阅读框 (ORF) 长 965 bp, 编码 317 个氨基酸; 泥鳅 *GNB2L1* 基因 cDNA 序列的开放阅读框长 965 bp, 编码 317 个氨基酸; 两种泥鳅 *GNB2L1* 基因编码的蛋白与其他鱼类的 RACK1 蛋白的同源性为 94% ~ 97%, 且不同进化地位物种的 *GNB2L1* 基因均由 8 个外显子和 7 个内含子组成。以 *GNB2L1* 基因为标记基因, 构建的鱼类系统发育树显示, 大鳞副泥鳅和泥鳅在进化上的亲缘关系最近。RT-PCR 结果显示, *GNB2L1* 基因在大鳞副泥鳅成体各组织中均有表达, 且在脑组织的表达量高于其他组织。以上结果表明, *GNB2L1* 基因为一个进化保守基因, 可能在大鳞副泥鳅的细胞活动中发挥着重要作用。

**关键词:** 泥鳅; G蛋白 $\beta 2$ 亚基类似物1基因 (*GNB2L1*); 蛋白激酶C受体 (RACK1); 组织表达

**中图分类号:** Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2015) 02-243-09

## Gene Structure, Expression and Phylogenetic Analysis of *GNB2L1* in Two Chinese Loaches

XU Ling-Hua<sup>①</sup> YAN Zhen-Jun<sup>②#</sup> LI Qiong<sup>①</sup> CAO Fang<sup>①</sup>

① *School of Chemistry and Chemical Engineering, Hubei Polytechnic University, Huangshi 435003*; ② *College of Life Science, Hubei Normal University, Huangshi 435002, China*

**Abstract:** As a member of the tryptophan-aspartate repeat (WD-repeat) family of proteins, the receptor for activated C kinase 1 (RACK1) is an intracellular adaptor protein that plays an important role in the regulation of various signaling pathways. In this study, the guanine-nucleotide-binding protein beta polypeptide 2-like 1 (*GNB2L1*) gene encoding RACK1 protein was cloned from the gonad of *Paramisgurnus dabryanus* by rapid

**基金项目** 湖北理工学院院级项目 (No. 08yjz14Q);

**第一作者介绍** 徐玲花, 女, 讲师; 研究方向: 生物化学与分子生物学; E-mail: linghua0317@126.com;

**#并列第一作者** 严镇钧, 男, 讲师; 研究方向: 遗传学; E-mail: p\_b@tom.com.

收稿日期: 2014-07-10, 修回日期: 2014-10-25 DOI: 10.13859/j.cjz.201502010

amplification of cDNA ends (RACE). The full-length cDNA of the *GNB2L1* gene is 1 115 bp and contains an open reading frame of 965 bp, encoding for a putative RACK1 protein with 317 amino acids. The *GNB2L1* gene was also isolated from the gonad of *Misgurnus anguillicaudatus* by gene cloning technique, which encodes 965 bp cDNA sequence and a putative RACK1 protein with 317 aa. Further analysis showed that RACK1 proteins of two loaches display 94% - 97% sequence similarities to those of other teleost fishes (Fig. 1), and the *GNB2L1* genes in vertebrates, including in teleost, have seven introns and eight exons (Fig. 2). The phylogenetic tree based on multiple sequence alignment of *GNB2L1* genes of two loaches and other closely related teleost fishes revealed the closest relationship between *M. anguillicaudatus* and *P. dabryanus* (Fig. 4). Semi-quantitative RT-PCR confirmed that *GNB2L1* gene was expressed ubiquitously in many *P. dabryanus* tissues, especially higher in the brain (Fig. 3). These results imply that *GNB2L1* gene is strongly conserved through evolution, and may be essential for cellular functions in *P. dabryanus*.

**Key words:** Loach; Guanine-nucleotide-binding protein beta polypeptide 2-like 1 (*GNB2L1*); Receptor for activated C kinase 1 (RACK1); Tissue expression

蛋白激酶C受体 (receptor for activated C kinase 1, RACK1) 是一个高度保守的锚定蛋白, 含有7个高度保守的色氨酸-天门冬氨酸 (tryptophan-aspartate, WD) 重复结构域, 属于WD40结构域蛋白家族成员。RACK1蛋白拥有多个结合部位 (Adams et al. 2011), 能与细胞内大量的信号蛋白, 如蛋白激酶C (protein kinase C, PKC) (Haberman et al. 2011)、酪氨酸激酶Src (Mamidipudi et al. 2007)、G 蛋白 $\beta$ 亚基 (Dell et al. 2002)、类胰岛素生长因子受体 I (insulin-like growth factor I, IGF- I) (Kiely et al. 2005) 等相结合, 在细胞信号转导通路、个体发育、生理节律、细胞迁移以及细胞粘着等生命过程中发挥着重要作用。

RACK1蛋白由G蛋白 $\beta$ 2亚基类似物1基因 (guanine-nucleotide-binding protein beta polypeptide 2-like 1, *GNB2L1*) 编码, 研究表明, *GNB2L1*基因在物种的多个组织中高度表达 (Wang et al. 2003), 且其在各组织中的表达受严格的调控, 异常的表达会导致脑障碍 (Wehner et al. 2011)、心力衰竭 (Pass et al. 2001)、肾衰竭 (Padanilam 2001)、肌萎缩 (Calura et al. 2008) 和癌症 (Li et al. 2014) 等疾病的产生。许多鱼类如斑马鱼 (*Danio rerio*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、白斑鱼

(*Sander vitreus*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和青鳉 (*Oryzias latipes*) 等的*GNB2L1*基因已被成功克隆 (Hamilton et al. 1999)。在斑马鱼中, RACK1蛋白能与Vangl2蛋白相互作用, 在平面细胞极化 (planar cell polarity, PCP) 通路中发挥重要的调控作用 (Li et al. 2011), 但 RACK1蛋白在其他鱼类生命活动中的功能未见报道。

大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 和泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 均为鲤形目鳅科鱼类, 是我国常见的泥鳅养殖品种。本文采用 RACE 技术对大鳞副泥鳅的 *GNB2L1* 同源基因进行了全长克隆, 采用基因克隆技术对泥鳅的 *GNB2L1* 同源基因的编码序列进行了测序, 采用 RT-PCR 技术对 *GNB2L1* 基因在大鳞副泥鳅不同组织中的表达进行了检测, 并以 *GNB2L1* 基因为分子标记, 对两种泥鳅的系统进化关系进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

大鳞副泥鳅和泥鳅均购自武汉市集贸市场, 为性成熟雌雄健壮个体。

### 1.2 引物

引物 UPM 为 BD Advantage RACE 试剂盒

(Clontech, USA) 提供, 引物 M13-47 和 RV-M 为质粒通用引物, 其他引物均为本实验室运用 Primer Premier 5.0 软件设计 (表 1), 由上海 Invitrogen 公司合成。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 总 RNA 提取** 采用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, USA) 提取大鳞副泥鳅脑、肝、肾、卵巢、脾、精巢、心等组织以及泥鳅精巢组织的总 RNA, 通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性和纯度, 用超微量分光光度计 (Nanovue, UK) 法定量 RNA 浓度。

**1.3.2 RACE** 按照 BD Advantage RACE 试剂盒操作手册的说明构建大鳞副泥鳅精巢的 SMART cDNA 库。采用 UPM 和 GNF1 为引物进行 5'-RACE 扩增, 采用 UPM 和 GNR1 为引物进行 3'-RACE 扩增。反应条件为, 94°C 30 s, 72°C 3 min, 5 个循环; 94°C 30 s, 70°C 30 s, 72°C 3 min, 5 个循环; 94°C 30 s, 68°C 30 s, 72°C 2 min, 25 个循环; 最后 72°C 延伸 8 min。扩增片段用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收,

克隆至 pGEM-T 载体 (Clontech, USA), 经菌液 PCR 和酶切两种方法筛选阳性克隆。阳性重组子由上海 Invitrogen 公司进行测序。

**1.3.3 全长序列鉴定** 运用 DNAMAN 软件将获得的 5'-RACE 和 3'-RACE 序列片段进行拼接, 结合测序峰图进行序列校正后获得大鳞副泥鳅 *GNB2L1* 基因全长序列。以大鳞副泥鳅精巢中提取的总 RNA 经 Oligo (dT) 引导反转录形成的 cDNA 为模板, 采用引物 GNF2 和 GNR2 扩增 *GNB2L1* 基因 cDNA 序列。扩增条件为, 94°C 预变性 5 min; 94°C 30 s, 56°C 40 s, 72°C 1.5 min, 35 个循环; 72°C 延伸 8 min。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段并回收, 克隆至 pGEM-T 载体, 经酶切检验, 阳性克隆送上海 Invitrogen 公司进行测序。利用软件 MEGA6.0 对序列进行比对确定 *GNB2L1* 基因全长序列的正确性。

**1.3.4 RT-PCR** 将提取的大鳞副泥鳅脑、肝、肾、脾、卵巢、精巢和心以及泥鳅精巢组织的

表 1 实验中所用引物的名称和序列

Table 1 Names and sequences of primers in this study

基因 Gene	引物名称 Primer names	引物序列 (5' - 3') Sequence	用途 Usage
<i>β-actin</i>	<i>β-actin</i> F	GCCGCCCTCGTCGTTGATAA	内参
	<i>β-actin</i> R	CGCAGCTCGTTGTAGAAGGTGTG	Internal control
	M13-47	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	阳性克隆筛选
	RV-M	GAGCGGATAACAATTCACACAGG	Screening of positive clone
大鳞副泥鳅 <i>Paramisgurnus dabryanus</i>			
<i>GNB2L1</i>	GNF1	GGTGTCTGCGTGCGCTTCT	基因全长扩增 RACE
	GNR1	AAACTGGGGTGTGGTGGCGAT	
	UPM*	Long (0.4 μmol/L): CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	全长验证 Head to toe
		Short (2 μmol/L): CTAATACGACTCACTATAGGGC	
	GNF2	ATGTTCTGAGCGTGGCTTCT	
GNR2	TGACTTTATCGGGTCCAATG		
泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>			
<i>GNB2L1</i>	GNBF	GAAAATGACCGAGCAGATG	基因扩增 Gene amplification
	GNBR	AAGCCACGCTCAGAACATCC	

\* 引物 UPM 由 0.4 μmol/L 长引物 (long) 和 2 μmol/L 短引物 (short) 组成。

The primer UPM is composed of a long primer (0.4 μmol/L) and a short primer (2 μmol/L).

总 RNA 用 DNase I 酶 (Promega, USA) 处理后, 以 Oligo (dT)<sub>18</sub> 为反转录引物, 用 M-MLV 反转录酶 (Promega, USA) 将 RNA 反转录成 cDNA, 同时以仅加水和不加反转录酶的两个反转录作为阴性对照。利用引物 GNF2 和 GNR2 扩增 大鳞副泥鳅 上述组织的 *GNB2L1* 基因片段, 扩增条件同上。利用引物 GNBF 和 GNBR 扩增 泥鳅精巢组织的 *GNB2L1* 基因片段。扩增条件为, 94°C 预变性 6 min; 94°C 50 s, 55°C 45 s, 72°C 60 s, 35 个循环; 72°C 延伸 6 min。利用引物  $\beta$ -actin F 和  $\beta$ -actin R 扩增 内参基因  $\beta$ -actin。扩增条件为, 94°C 预变性 6 min; 94°C 30 s, 50°C 40 s, 72°C 50 s, 35 个循环; 72°C 延伸 6 min。扩增的泥鳅精巢组织 *GNB2L1* 基因片段用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收, 克隆后进行测序, 方法同上。

**1.3.5 序列分析** 将 *GNB2L1* 基因全长序列输入 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行 Blast X 及 Blast N 同源性检索, 并从 GenBank 数据库中下载相关物种 *GNB2L1* 基因的 cDNA 序列、编码氨基酸序列以及基因组序列。利用 ORF Finder 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 在线分析基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF); 利用 Lasergene 软件分析 *GNB2L1* 基因结构; 利用 [http://us.expasy.org/cgi-bin/pi\\_tool](http://us.expasy.org/cgi-bin/pi_tool) 在线工具预测基因编码蛋白的特性; 利用 ClustalW 软件 (Larkin et al. 2007) 进行多序列比对, 用 MEGA 6.0 软件和 MrBayes v3.1 软件构建最大似然树和贝叶斯树 (Ronquist et al. 2003, Tamura et al. 2011), 最后用自展法 (Bootstrap) 对构建的系统进化树进行分析和评价, 随机数种子 (random number seed) 设置为 111, 重复取样次数 (number of bootstrap trials) 为 1 000。

## 2 结果

### 2.1 *GNB2L1* 基因序列

经 5'-RACE 和 3'-RACE 及序列克隆和基因全长拼接与验证, 大鳞副泥鳅 *GNB2L1* 基因

cDNA 序列全长 1 115 bp (GenBank 登录号为 ACV53651), 94 ~ 1 047 bp 位点为一个开放阅读框 (ORF), 编码含 317 个氨基酸残基的蛋白质, 预测分子量为 35.05 ku, 等电点为 7.58。以泥鳅精巢 cDNA 为模板, 扩增的泥鳅 *GNB2L1* 基因 cDNA 序列的 ORF 长 965 bp, 编码含 317 个氨基酸残基的蛋白质, 预测分子量为 35.07 ku, 等电点为 7.60。

氨基酸序列同源性比较显示, 大鳞副泥鳅和泥鳅 *GNB2L1* 基因编码的蛋白质只有 6 个氨基酸残基的区别, 它们与斑马鱼 (NM131444)、白斑鱼 (ABX90099)、虹鳟 (AHG98209)、青鳉 (XP004073369)、尼罗罗非鱼 (NP001266445)、墨西哥脂鲤 (*Astyanax mexicanus*, XP007244608)、斑马宫丽鱼 (*Maylandia zebra*, XP004540947)、毛鳞鱼 (*Osmerus mordax*, ACO09909)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*, NP001187435)、剑鱼 (*Xiphophorus maculatus*, XP005795376)、梭子鱼 (*Esox lucius*, ACO14497)、蓝鲈鱼 (*Ictalurus furcatus*, ADO27998)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*, XP003970442)、真白鲑 (*Coregonus lavaretus*, AHG98119)、河鲈 (*Thymallus thymallus*, AHG98116) 等鱼类的 RACK1 蛋白序列同源性为 94% ~ 97%。这表明大鳞副泥鳅和泥鳅 *GNB2L1* 基因编码的是 RACK1 同源蛋白, 且 RACK1 蛋白在鱼类中具有高度的保守性。

### 2.2 *GNB2L1* 基因结构分析

不同物种 RACK1 蛋白序列比对表明, 两种泥鳅的 RACK1 蛋白序列与秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*, NP501859)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*, NP477269)、小家鼠 (*Mus musculus*, NP032169)、人 (*Homo sapiens*, NP006089) 及斑马鱼 (NP571519) 等不同进化等级物种均有很高同源性, 且都含有 7 个高度保守的色氨酸-天门冬氨酸 (WD) 重复结构域, 属于 WD40 家族成员 (图 1)。为了解两种泥鳅 *GNB2L1* 基因的结构特点, 对尼罗罗非鱼 (NC022200)、青鳉 (NC019868)、红鳍东

人 <i>Homo sapiens</i>	MTEQMTLRGTLKGHNGWVTQIATTPQ-FPDMILSASRDKTIIMWKLTRD--E-TNYGIPQRALR 60
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	MTEQMTLRGTLKGHNGWVTQIATTPQ-FPDMILSASRDKTIIMWKLTRD--E-TNYGIPQRALR 60
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	MTEQMTVRGTLKGHSGWVTQIATTPQ-FPDMILSASRDKTIIMWKLTRD--E-TNYGIPQRALR 60
大鳞副泥鳅 <i>Paramisgurnus dabryanus</i>	MTEQMTVRGTLKGHSGWVTQIATTPQ-FPDMILSASRDKSVIMWKLTRD--E-TNYGIPQRALK 60
泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	MTEQMTVRGTLKGHSGWVTQIATTPQ-FPDMILSASRDKSVIMWKLTRD--E-TNYGIPQRALK 60
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	MSETLQLRGTLIGHNGWVTQIATNPK-DPDTIISASRDKTLIVWKLTRD--EDTNYGYPKRRLY 61
秀丽线虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>	VQEQMKLTGTLEHTGWVTQIATYTRNDKTTVLSSSRDKTILVWDVDSVAPVDEGPIGRPVRSLT 65 : * : : *** ** :***** : :*:***:***: : * * : *
人 <i>Homo sapiens</i>	GHSHFVSDVVISSDGGFALSGSWDGLRLWDLTTGTTTRRFVGHGTDVLSVAFSSDNQRQIVSGSR 125
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	GHSHFVSDVVISSDGGFALSGSWDGLRLWDLTTGTTTRRFVGHGTDVLSVAFSSDNQRQIVSGSR 125
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	GHSHFVSDVVISSDGGFALSGSWDGLRLWDLTTGTTTRRFVGHGTDVLSVAFSADNRQIVSGSR 125
大鳞副泥鳅 <i>Paramisgurnus dabryanus</i>	GHSHFVSDVVISSDGGFALSGSWDGLRLWDLTTGTTTRRFVGHGTDVLSVAFSADNRQIVSGSR 125
泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	GHSHFVSDVVISSDGGFALSGSWDGLRLWDLTTGTTTRRFVGHGTDVLSVAFSADNRQIVSGSR 125
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	GHSHFVSDVVISSDGGFALSGSWDGLRLWDLAAGKTRRFEGHTKDVLVAFSADNRQIVSGSR 126
秀丽线虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>	GHNHFVSDVVISSDGGFALSGSWDKTLRLWDLNQGVSSTRQFI SHTKDVLVAFSADNRQIVSGSR 130 **:*:***:***:***** ***** * :*: * .*****:*****:*****
人 <i>Homo sapiens</i>	DKTIKLNWTLGVCKYTVQDESHSEWVSCVRFSPNSSNPIIVSCGWDKLVKVVWLANCKLKTNHIG 190
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	DKTIKLNWTLGVCKYTVQDESHSEWVSCVRFSPNSSNPIIVSCGWDKLVKVVWLANCKLKTNHIG 190
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	DKTIKLNWTLGVCKYTIQDSDHTEWVSCVRFSPNSSNPIIVSCGWDKLVKVVWLANCKLKTNHIG 190
大鳞副泥鳅 <i>Paramisgurnus dabryanus</i>	DKTIKLNWTLGVCKYTIQDSDHTEWVSCVRFSPNSSNPIIVSCGWDKLVKVVWLANCKLKTNHIG 190
泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	DKTIKLNWTLGVCKYTIQDSDHTEWVSCVRFSPNSSNPIIVSCGWDKLVKVVWLANCKLKTNHIG 190
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	DKTIKLNWTLAECKFTIQDGHGHTDWWVSCVRFSPNHSNPIIVSCGWDRTVWVWLANCKLKNHHG 191
秀丽线虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>	DKSIKLNWTLAQCKYTIQDGHGHTDWWVSCVRFSPNRPVIVSAGWDKVVWVWLANCKLKTNHIG 195 **:*:***:***:***** ***** * :*: * .*****:*****:*****
人 <i>Homo sapiens</i>	HTGYLNTVTVSPDGLSCASGGKDGQAMLWDLNEGKHLTYLDGGDIINALCFSPNRYWLCATGPS 255
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	HTGYLNTVTVSPDGLSCASGGKDGQAMLWDLNEGKHLTYLDGGDIINALCFSPNRYWLCATGPS 255
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	HTGYLNTVTVSPDGLSCASGGKDGQAMLWDLNEGKHLTYLDGGDIINALCFSPNRYWLCATGPS 255
大鳞副泥鳅 <i>Paramisgurnus dabryanus</i>	HTGYLNTVTVSPDGLSCASGGKDGQAMLWDLNEGKHLTYLDGGDIINALCFSPNRYWLCATGPS 255
泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	HTGYLNTVTVSPDGLSCASGGKDGQAMLWDLNEGKHLTYLDGGDIINALCFSPNRYWLCATGPS 255
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	HNGYLNNTVTVSPDGLSCTSGGKDSKALLWDLNDGKNLYTLEHNDIINALCFSPNRYWLCVAYGPS 256
秀丽线虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>	HTGYVNTVTVSPDGLSCASGGKDGQAMLWDLNEGKHLTYLPGNDVINAMFSPNRYWLCVAYGSS 260 * .**:*:***:***:***** ***** * :*: * .*****:*****:*****
人 <i>Homo sapiens</i>	IKIWDLEGKIIVDELKQEVIST-SKAEPQCTSLAWSADGQTLFAGYTDNLRVWQVTIGTR- 317
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	IKIWDLEGKIIVDELKQEVIST-SKAEPQCTSLAWSADGQTLFAGYTDNLRVWQVTIGTR- 317
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	IKIWDLEGKIIVDELQRDIIITN-SKAEPQCTSLAWSADGQTLFAGYTDNLRVWQVTIGTR- 317
大鳞副泥鳅 <i>Paramisgurnus dabryanus</i>	IKIWDLEGKIIVDELKQEVITN-SKAEPQCTSLAWSADGQTLFAGYTDNLRVWQVTIGTR- 317
泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	IKIWDLEGKIIVDELQRDIIITN-SKAEPQCTSLAWSADGQTLFAGYTDNLRVWQVTIGTR- 317
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	IKIWDLACKKTVVEELRPEVVVPT-SKADQPCLSLAWSADGQTLFAGYTDNLRVWQVSVSAH- 318
秀丽线虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>	IKIWDLEDKKEIEELKPEIASGSSRGSSPQCISLAWSDGQTLFAGYTDNLRVWQVSVIRASN 324 ***** * :*: * : : * :. * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * *

图 1 七个物种 RACK1 氨基酸序列比对

Fig. 1 Sequence alignment of RACK1 amino acid from seven species

“\*”表示完全保守的氨基酸位点,“:”表示不完全保守位点,“.”表示半保守位点,下划线表示7个保守的WD重复区域。

Fully conserved residues are marked with an asterisk; conservative and semiconservative positions are marked with colons and periods respectively; seven conserved WD domains are marked with underlines.

方鲀 (NC018903) 以及人类 (NC000005)、小家鼠 (NC000077)、家犬 (*Canis lupus familiaris*, NC006593) 6物种 *GNB2L1* 基因的cDNA序列和基因组序列进行了比对。这6个物种的 *GNB2L1* 基因均由8个外显子和7个内含子组成,且内含子的插入位点在不同物种具有一致性(图2)。这一结果表明 *GNB2L1* 基因在进化上表现出高

度的保守性,暗示着 *GNB2L1* 基因在不同物种中具有类似的基因结构,为进一步获取大鳞副泥鳅和泥鳅 *GNB2L1* 基因全序列提供了依据。

### 2.3 *GNB2L1* 基因的表达

分别以大鳞副泥鳅脑、肝、肾、脾、卵巢、精巢和心组织的cDNA为模板进行RT-PCR,检测 *GNB2L1* 基因在不同组织中的表达情况。结果

	Exon1	Intron1	Exon2	Intron2	Exon3	Intron3	Exon4	
人 <i>Homo sapiens</i>	--CGAGgtac--	<b>ttag</b> ATAA--	AACG <b>caag</b> --	caggGGCA--	CAGG <b>taaa</b> --	<b>tagg</b> ATGA--	AGGT <b>gagc</b> --	
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	--CGAGgtac--	<b>ttag</b> ACAA--	AACG <b>caag</b> --	taggGGCA--	CAGG <b>taaa</b> --	<b>tagg</b> ATGA--	AGGT <b>aagc</b> --	
家犬 <i>Canis lupus familiaris</i>	--CGAGgtac--	<b>ttag</b> ATAA--	AACG <b>caag</b> --	caggGGTA--	CAGG <b>taac</b> --	<b>cgag</b> AGCC--	AGGT <b>gagc</b> --	
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	--CGAGgtga--	<b>tcag</b> ACAA--	CCAC <b>gtaa</b> --	<b>ctag</b> TGGT--	CAGG <b>gtaa</b> --	<b>cagg</b> ATGA--	AGGT <b>atgt</b> --	
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	--CGAGgtga--	<b>acag</b> ACAA--	CTAC <b>gtaa</b> --	<b>acag</b> TGGA--	CAGG <b>taaa</b> --	<b>cagg</b> ACGA--	AGGT <b>actg</b> --	
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	--CGAGgtga--	<b>tcag</b> ACAA--	CCAC <b>gtaa</b> --	<b>tcag</b> AGGG--	CAGG <b>tgag</b> --	<b>cagg</b> ATGA--	AGGT <b>ttgt</b> --	
	Intron4	Exon5	Intron5	Exon6	Intron6	Exon7	Intron7	Exon8
人 <i>Homo sapiens</i>	--aggtATGG--	AAGG <b>tatt</b> --	<b>cagg</b> ATGG--	TGGG <b>tgag</b> --	<b>cagg</b> ATTT--	CCAG <b>gtaa</b> --	<b>gcag</b> ACTC--	
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	--aggtGTGG--	AAGG <b>tatt</b> --	<b>cagg</b> ATGG--	TGGG <b>taag</b> --	<b>cagg</b> ACTT--	CCAG <b>gtaa</b> --	<b>acag</b> ACTC--	
家犬 <i>Canis lupus familiaris</i>	--aggtATGG--	AAGG <b>tatt</b> --	<b>cagg</b> ATGG--	TGGG <b>tgag</b> --	<b>cagg</b> ACTT--	CCAG <b>gtaa</b> --	<b>gcag</b> ACTC--	
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	--aggtGTGG--	AAGG <b>taag</b> --	<b>tagg</b> ATGG--	TGGG <b>taag</b> --	<b>tagg</b> ATCT--	ACAG <b>gtaa</b> --	<b>acag</b> ACCC--	
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	--aggtGTGG--	AGGG <b>taag</b> --	<b>cagg</b> ATGG--	TGGG <b>taaa</b> --	<b>cagg</b> ATCT--	ACAG <b>gtaa</b> --	<b>tcag</b> ACCC--	
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	--aggtGTGG--	AAGG <b>taag</b> --	<b>cagg</b> ACGG--	TGGG <b>tgag</b> --	<b>cagg</b> ATCT--	ACAG <b>gtaa</b> --	<b>gcag</b> ACCC--	

图 2 六个物种 *GNB2L1* 基因组序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of *GNB2L1* gene from six species

大写字母表示外显子核苷酸，小写字母表示内含子核苷酸，加粗的核苷酸为内含子剪接位点。

The capital and small letters indicate exons and introns, respectively. Splicing sites of introns were bolded.

表明，*GNB2L1* 基因在大鳞副泥鳅的上述组织中均有一定的表达（图3），且在肝、肾、脾、卵巢、精巢和心等组织中的相对表达量不存在显著差异（ $P > 0.05$ ），而在脑组织中的相对表达量显著高于其他组织中的相对表达量（ $P < 0.05$ ）。

### 2.4 *GNB2L1* 基因结构与进化分析

以 *GNB2L1* 为标记基因构建的鱼类系统进化树表明（图4），斑马宫丽鱼、尼罗罗非鱼、

剑鱼、毛鳞鱼、梭子鱼和虹鳟等物种聚类于一个大的分支，它们隶属于真骨下纲（Teleostei）原棘鳍总目（Protacanthopterygii），而斑马鱼、大鳞副泥鳅、泥鳅、斑点叉尾鲷和墨西哥脂鲤聚类于另一个大的分支，隶属于真骨下纲骨鳉总目（Ostariophysi），这些鱼类在进化树上的分类位置与其传统分类位置基本一致。同时，大鳞副泥鳅和泥鳅聚为一姐妹分支，表明大鳞副泥鳅和泥鳅亲缘关系最近。

### 3 讨论

RACK1 蛋白是与 G 蛋白的  $\beta$  亚基（ $G\beta$ ）具有高度同源性的支架蛋白，能与许多蛋白质相互作用发挥各种生物功能（Adams et al. 2011）。近年的研究表明，RACK1 蛋白参与了植物、微生物以及动物个体发育的过程，如 RACK1 蛋白能影响斑马鱼细胞中 Vangl2 蛋白的膜定位以及原肠胚的形成（Li et al. 2011），RACK1 蛋白与酪氨酸蛋白激酶的相互作用与非非洲爪蟾（*Xenopus laevis*）脑神经管的闭合密切相关（Wehner et al. 2011），与 RACK1 蛋白同源的  $G\beta$  是酵母杂交信号的重要介导体（Bardwell 2005）。大鳞副泥鳅和泥鳅 *GNB2L1*

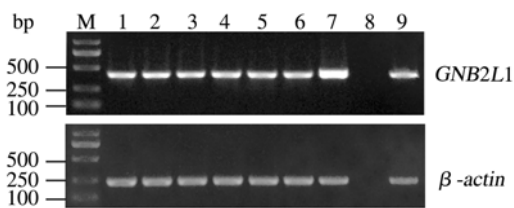


图3 *GNB2L1* 基因在大鳞副泥鳅不同组织中的半定量表达

Fig. 3 Expression of *GNB2L1* gene detected by RT-PCR in tissues of *Paramisgurnus dabryanus*

M. DL 2000 分子量标准；1. 精巢；2. 心；3. 肾；4. 卵巢；5. 脾；6. 肝；7. 脑；8. 阴性对照；9. 阳性对照。

M. DL 2000 marker; 1. Testis; 2. Heart; 3. Kidney; 4. Ovary; 5. Spleen; 6. Liver; 7. Brain; 8. Negative control; 9. Positive control.

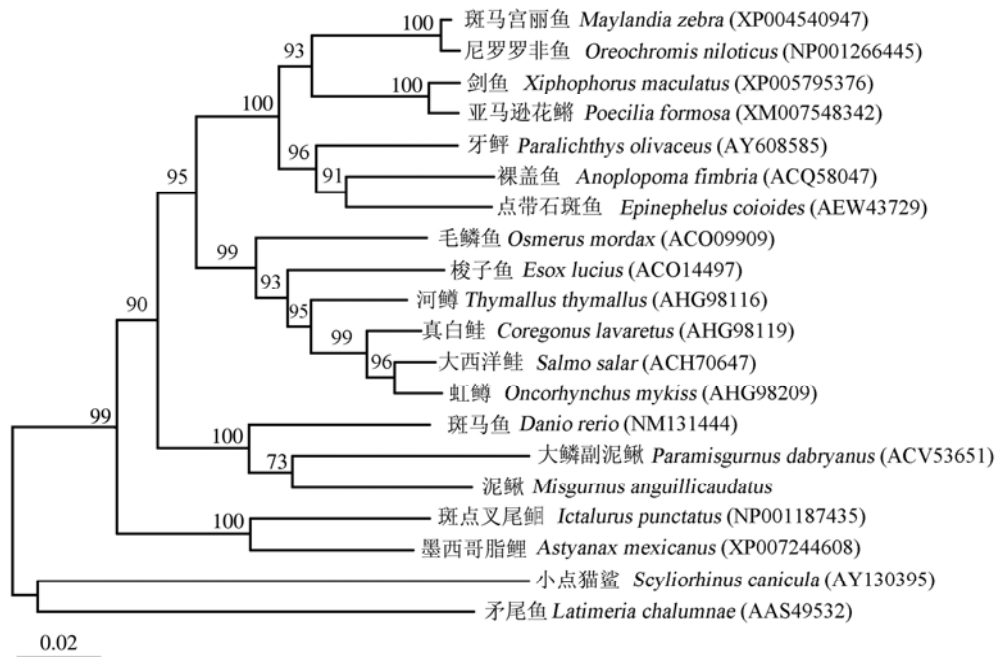


图4 基于*GNB2L1*基因构建的鱼类系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on multiple sequence alignment of *GNB2L1* genes of teleost

分支值 > 70%显示在系统进化树的分支处, 标尺表示每个核苷酸位点的取代率为0.02。

Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replicates) that are > 70% are shown at branch points. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position.

基因最初是在精巢 cDNA 中筛选得到的, 且都编码包含 7 个 WD40 结构域的 RACK1 蛋白, RT-PCR 结果也表明, 该基因在大鳞副泥鳅成体卵巢和精巢中均有表达, 我们推测 RACK1 蛋白在大鳞副泥鳅和泥鳅的性别分化发育分子机制中起到一定的介导作用, 需进一步实验证明。

尽管 *GNB2L1* 基因在许多物种的不同组织中都有表达, 但其在物种的不同组织和不同发育时期的表达受到严格调控 (Adams et al. 2011)。研究表明, RACK1 蛋白在不同的脑部区域能与不同的信号分子相互作用, 且在神经系统中, RACK1 蛋白能与蛋白激酶 C (PKC) 结合, 参与离子通道 (Feng et al. 2001)、受体脱敏、神经递质释放 (Ashique et al. 2006)、突触发生 (Rosdahl et al. 2002) 以及昼夜节律 (Robles et al. 2010) 等生理活动的调控。

*GNB2L1* 基因在大鳞副泥鳅成体的各个组织中均有表达, 但在脑中的表达量较高。这表明与在其他生命体中一样, RACK1 蛋白在大鳞副泥鳅的信号传导通路中发挥重要作用, 同时也暗示着 RACK1 蛋白可能与 PKC 等激酶或磷酸酶相互作用参与了大鳞副泥鳅神经系统信号的传导。

RACK1 为一个保守的蛋白质, 不同进化地位物种的 RACK1 蛋白均存在较高的同源性 (Adams et al. 2011), 本论文对不同进化地位物种的 *GNB2L1* 基因序列和 RACK1 蛋白序列的比对结果也表明, *GNB2L1* 在进化上存在极高的保守性。这种高度的保守性为我们的分子系统学研究提供了分子标记。大鳞副泥鳅和泥鳅是进化关系很近的两个种, 曾经被划分为一个种。目前, 对大鳞副泥鳅和泥鳅的分类, 主要依据纵列鳞数目 (卢国兴等 2012)、颌须与

头长之比、皮褶长与体长之比、体高与体长之比等形态特征(王元军 2008)。本文以 *GNB2L1* 基因为标记基因构建的系统进化树揭示了大鳞副泥鳅和泥鳅两个物种的亲缘关系,为两种泥鳅的进化亲缘关系提供了分子水平上的分类依据。

## 参 考 文 献

- Adams D R, Ron D, Kiely P A. 2011. RACK1, a multifaceted scaffolding protein: structure and function. *Cell Communication and Signaling*, 9(1): 22.
- Ashique A M, Kharazia V, Yaka R, et al. 2006. Localization of the scaffolding protein RACK1 in the developing and adult mouse brain. *Brain Research*, 1069(1): 31–38.
- Bardwell L. 2005. A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides*, 26(2): 339–350.
- Calura E, Cagnin S, Raffaello A, et al. 2008. Meta-analysis of expression signatures of muscle atrophy: gene interaction networks in early and late stages. *BMC Genomics*, 9(1): 630.
- Dell E J, Connor J, Chen S H, et al. 2002. The betagamma subunit of heterotrimeric G proteins interacts with RACK1 and two other WD repeat proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(51): 49888–49895.
- Feng J, Cai X, Zhao J H, et al. 2001. Serotonin receptors modulate GABA<sub>A</sub> receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons. *The Journal of Neuroscience*, 21(17): 6502–6511.
- Haberman Y, Alon L T, Eliyahu E, et al. 2011. Receptor for activated C kinase (RACK) and protein kinase C (PKC) in egg activation. *Theriogenology*, 75(1): 80–89.
- Hamilton L C, Wright J M. 1999. Isolation of complementary DNAs coding for a receptor for activated C kinase (RACK) from zebrafish (*Danio rerio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*): constitutive developmental and tissue expression. *Marine Biotechnology*, 1(3): 279–285.
- Kiely P A, Leahy M, O’Gorman D, et al. 2005. RACK1-mediated integration of adhesion and insulin-like growth factor I (IGF- I) signaling and cell migration are defective in cells expressing an IGF- I receptor mutated at tyrosines 1250 and 1251. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9): 7624–7633.
- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948.
- Li J J, Xie D. 2014. RACK1, a versatile hub in cancer. *Oncogene*, doi: 10.1038/onc.2014.127.
- Li S D, Esterberg R, Lachance V, et al. 2011. Rack1 is required for Vangl2 membrane localization and planar cell polarity signaling while attenuating canonical Wnt activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(6): 2264–2269.
- Mamidipudi V, Dhillon N K, Parman T, et al. 2007. RACK1 inhibits colonic cell growth by regulating Src activity at cell cycle checkpoints. *Oncogene*, 26(20): 2914–2924.
- Padanilam B J. 2001. Induction and subcellular localization of protein kinase C isozymes following renal ischemia. *Kidney International*, 59(5): 1789–1797.
- Pass J M, Gao J M, Jones W K, et al. 2001. Enhanced PKC $\beta$ II translocation and PKC $\beta$  II -RACK1 interactions in PKC $\epsilon$ -induced heart failure: A role for RACK1. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 281(6): H2500–H2510.
- Robles M S, Boyault C, Knutti D, et al. 2010. Identification of RACK1 and protein kinase C $\alpha$  as integral components of the mammalian circadian clock. *Science*, 327(5964): 463–466.
- Ronquist F, Huelsenbeck J P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12): 1572–1574.
- Rosdahl J A, Mourton T L, Brady-Kalnay S M. 2002. Protein kinase C  $\delta$  (PKC  $\delta$ ) is required for protein tyrosine phosphatase  $\mu$  (PTP $\mu$ )-dependent neurite outgrowth. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 19(2): 292–306.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731–2739.
- Wang S, Chen J Z, Zhang Z, et al. 2003. Cloning, expression and genomic structure of a novel human *GNB2L1* gene, which



- encodes a receptor of activated protein kinase C (RACK). *Molecular Biology Reports*, 30(1): 53–60.
- 卢国兴, 储张杰, 胡廷尖, 等. 2012. 舟山群岛大鳞副泥鳅与真泥鳅形态特征比较研究. *淡水渔业*, 42(4): 88–90.
- Wehner P, Shnitsar I, Urlaub H, et al. 2011. RACK1 is a novel interaction partner of PTK7 that is required for neural tube closure. *Development*, 138(7): 1321–1327.
- 王元军. 2008. 基于判别分析的泥鳅和大鳞副泥鳅识别. *安徽农业科学*, 36(2): 564, 568.

## 四川都江堰东方草鸮的繁殖记录

### Notes on Breeding of Eastern Grass Owl (*Tyto longimembris*) in Dujiangyan, Sichuan, China

东方草鸮(*Tyto longimembris*)隶属于鸮形目草鸮科,共有 6 个亚种的分化,我国分布的 2 个亚种为 *T. l. chinensis* 和 *T. l. pithecops*。东方草鸮在我国主要分布于西南和华南(*chinensis*)以及台湾(*pithecops*)。国外分布于印度次大陆、东南亚、菲律宾、新几内亚岛和澳大利亚(del Hoyo et al. 1999, 郑光美 2011)。在《中国鸟类分类与分布名录》(第二版)中,东方草鸮的分布区并不包括四川省。实际上,早在 2000 年时就曾有报道称在四川省南充市高坪区发现草鸮的分布(胡锦涛 2000),一直未能引起关注。有关东方草鸮繁殖生物学的资料,大多来自国外的研究,国内只有少量记载(谭维之等 1987, 刘小如等 2010)。2014 年 9 月,在四川都江堰般若寺林区进行野外考察时,我们发现了一个东方草鸮的巢,报道如下。

2014 年 9 月 1 日 13 时,偶然惊飞 1 只东方草鸮(见封 4 图 1),并发现其巢址,当时还没有产卵。直至 9 月 6 日 17:30 时,发现巢中已有 1 枚卵。9 月 7 日 17:30 时,巢中有卵 2 枚。9 月 10 日 14:30 时和 9 月 11 日 18:00 时,巢中有 3 枚卵。9 月 19 日 13:30 时、9 月 20 日 10:00 时和 9 月 27 日 13:30 时,巢中有卵 5 枚。10 月 1 日 10:00 时查看时,未见草鸮从巢中飞离,巢中的 5 枚卵已全部消失,但巢完好,原因未知。

该草鸮巢位于一南北走向的半山坡上(31°04'N, 103°43'E, 海拔 696 m),紧邻都江堰市至莲花湖的旅游公路。山坡上半部为次生林,下半部则为人工种植的桂花(*Osmanthus fragrans*)、厚朴(*Magnolia officinalis*)以及浓密的高草丛。巢址位于斜坡下半部一个密生高草的平台上,紧邻一条南北走向的小路,距离次生林边缘约 15 m。草鸮营地面巢,巢内垫有少许草茎、树叶和自身羽毛。巢位于高约 1 m 的浓密草丛中,形成一个内部呈半球状的巢室,凭借一通道进出。巢口向东,巢口宽 25 cm,高 35 cm。巢卵的中心位置距巢口 55 cm,巢洞进深 85 cm,洞内宽 65 cm,洞内高 45 cm(见封 4 图 2, 3)。

草鸮卵呈椭圆形,白色并有深浅不一的血迹,血迹颜色随着时间推移逐渐变淡。9 月 19 日对 5 枚卵进行了测量,平均卵重( $21.06 \pm 0.87$ ) g (19.7 ~ 23.0 g),长径( $40.46 \pm 0.63$ ) mm (38.99 ~ 42.43 mm),短径( $31.54 \pm 0.87$ ) mm (31.19 ~ 32.00 mm)。

据文献报道,草鸮的巢通常位于 1 m 多高的致密草丛中,并远离树林;窝卵数在印度为 4 ~ 6 枚,在澳大利亚为 3 ~ 8 枚(del Hoyo et al. 1999),这与我们的观察结果相似。此外,草鸮进出巢室通常都有多条通道(del Hoyo et al. 1999),而我们观察的这个巢仅有 1 条通道。

唐林芳<sup>①②</sup> 贾陈喜<sup>①\*</sup>

① 中国科学院动物研究所 北京 100101; ② 中国科学院大学 北京 100049

基金项目 国家自然科学基金重点项目(No. 31330013);

\* 通讯作者, E-mail: jiaox@ioz.ac.cn;

第一作者简介 唐林芳,女,硕士研究生;研究方向:鸟类分类与进化;E-mail: tanglinfang0314@163.com.

收稿日期: 2014-12-12, 修回日期: 2015-03-12 DOI: 10.13859/j.cjz.201502023