

野桑蚕乳酸脱氢酶基因的克隆与表达分析

武安泉, 张永亮*, 赵锦慧

(周口师范学院 生命科学与农学院, 河南 周口 466001)

摘要: 为了研究野桑蚕乳酸脱氢酶基因的功能, 选择野桑蚕 5 龄 3 日幼虫的组织及不同发育时期的个体, 利用 PCR 技术对野桑蚕乳酸脱氢酶基因进行克隆, 得到野桑蚕乳酸脱氢酶基因开放阅读框长度为 996 bp, 没有内含子, 只有 1 个外显子。该基因编码的蛋白含有 331 个氨基酸残基, 等电点为 6.76, 分子量为 36.35 kD。氨基酸序列分析表明, 该蛋白高度保守, 亚细胞定位预测分析表明该蛋白主要定位于细胞质中。转录表达分析表明, 该基因在野桑蚕 5 龄 3 日幼虫的组织(马氏管、中肠、表皮、脂肪体、丝腺、血液、精巢和卵巢)及不同发育时期的个体(卵、幼虫、蛹和蛾)中均有表达, 且表达量趋于一致。表明乳酸脱氢酶基因在野桑蚕的生命活动中可能具有重要的生理功能。

关键词: 野桑蚕; 乳酸脱氢酶基因; 克隆; 表达

中图分类号: S881.2 Q812 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)10-0131-04

Cloning and Expression Profiling Analysis of *Bombyx mandarina* LDH Gene

WU An-quan, ZHANG Yong-liang*, ZHAO Jin-hui

(College of Life Science and Agronomy, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China)

Abstract: In order to explore the functions of lactate dehydrogenase(LDH), using the different tissues of 3 day of fifth instar larvae and the different developmental stages individuals, the LDH gene from *Bombyx mandarina* was cloned by polymerase chain reaction. The results showed that the open reading frame of LDH was 996 bp, encoding 331 amino acid, containing 1 exon, no intron, and a predicted pI of 6.76 and molecular weight of 36.35 kD. The deduced amino acid sequence was highly conserved. The predicted analysis showed that the LDH was located in the cytoplasm. Transcriptal expression pattern revealed that the LDH was expressed in the tissues (malpighian tubule, midgut, epidermis, fat body, silk gland, blood, testis, ovary) and developmental stages (egg, larva, pupa, moth), and the expression level was almost consistent. LDH may play an important physiological function in vital movement of *Bombyx mandarina*.

Key words: *Bombyx mandarina*; LDH gene; cloning; expression

乳酸脱氢酶(LDH)广泛存在于各种生物体中, 它能催化丙酮酸还原成乳酸, 在葡萄糖的厌氧代谢中起着极为重要的作用。乳酸脱氢酶有不同类型的同工酶, 它们的理化性质、发育调控作用及生物学功能均不同^[1-6]。郑玉才等^[7]采用反转录

PCR(RT-PCR)方法克隆牦牛乳酸脱氢酶 B 基因 cDNA 全长序列发现, 突变的 2 个氨基酸都能产生新的 H 键, 影响整个蛋白分子的 H 键网络。李剑等^[8]克隆了乳杆菌中的 D-乳酸脱氢酶基因, 其开放阅读框编码的蛋白含 331 个氨基酸残基, 采用

收稿日期: 2014-03-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271627); 河南省教育厅自然科学基金项目(2010A230016); 周口师范学院博士科研启动基金项目; 周口师范学院校级重点学科建设经费资助项目

作者简介: 武安泉(1973-), 男, 河南西峡人, 讲师, 硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: wuanquan19@163.com

* 通讯作者: 张永亮(1967-), 男, 河南驻马店人, 副教授, 博士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。

E-mail: zylxndx@163.com

非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测证明其阳性克隆表现出 D-乳酸脱氢酶活性。杜武英等^[9]从猪带绦虫成虫 cDNA 文库中识别乳酸脱氢酶 A, 并对其克隆、表达分析。该基因全长 1 332 bp, 编码 331 个氨基酸, 具有乳酸脱氢酶保守结构域。梅眉等^[10]克隆了南方根结线虫乳酸脱氢酶基因, 该基因包含 1 个完整的编码框序列, 编码 315 个氨基酸。目前, 对昆虫乳酸脱氢酶的研究报道却极少。野桑蚕是农业鳞翅目蚕蛾科害虫, 终年危害桑树, 迄今尚未见有关野桑蚕乳酸脱氢酶基因的研究报道。为此, 本研究采用 PCR 技术克隆野桑蚕乳酸脱氢酶基因并进行序列特征分析, 并检测了该基因转录表达情况, 旨在为进一步研究该基因的功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料及主要试剂

野桑蚕 5 龄 3 日幼虫的各组织及卵, 5 龄 3 日幼虫、蛹和蛾的个体, 由河南省蚕业科学研究所提供。

TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, RNA 酶抑制剂、DNA 聚合酶、M-MLV 反转录酶均为美国 Promega 公司产品, 胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司, pMD19-T 载体为 TaKaRa 公司产品。

1.2 野桑蚕 5 龄 3 日幼虫组织及不同发育时期个体 RNA 的提取及 cDNA 的合成

用液氮快速充分研磨野桑蚕 5 龄 3 日幼虫的马氏管、血液、中肠、表皮、脂肪体、丝腺、精巢和卵巢组织及卵、幼虫、蛹和蛾个体后, 参照 TRIzol 试剂的使用说明书提取 RNA, 电泳检测提取 RNA 的质量。以 Oligo(dT) 为引物, 用 M-MLV 反转录酶反转录反应体系为: M-MLV 5×Buffer 5.0 μL, dNTP 5.0 μL, RNasin 0.5 μL, DEPC 处理的水 6.5 μL; 反应条件为: 70℃ 温浴 10 min, 然后加 M-MLV 反转录酶 1.0 μL, 42℃ 水浴 60 min。

1.3 野桑蚕 LDH 基因的克隆

根据登录在 NCBI 上的家蚕 LDH 基因序列设计 PCR 特异引物, 上游引物序列: 5'-CAGTATTA-AATAAACAAGATGGA-3'; 下游引物序列: 5'-GATGCATTCGCGTTAGAATTTAA-3'。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以野桑蚕 5 龄 3 日个体的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。25 μL PCR 反应体系为: 10×PCR 反应缓冲液 2.5 μL,

0.2 mmol/L dNTP 2 μL, 1.5 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL, 2.5 μmol/L 的正、反向引物各 1 μL, DNA 聚合酶 1 U, cDNA 模版 1 μL, 加去离子水补足至 25 μL。PCR 扩增程序为: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 43 s, 55.3℃ 48 s, 72℃ 70 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。扩增产物用 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化后, 与 pMD19-T 载体连接, 转化 *E. coli* JM109, 挑选阳性克隆送上海英俊生物技术公司测序。

1.4 野桑蚕 LDH 生物信息学分析方法

利用 NCBI 中的 BLAST 程序对 LDH 基因进行同源性比对, 采用 ExPASy 在线 (<http://au.expasy.org/tools>) 预测 LDH 蛋白的分子量和等电点, 采用 EMBnet 在线 (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 计算 LDH 疏水性, 采用 SMART 在线 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测 LDH 的结构域, 使用 PSORT 在线工具 (<http://psort.hgc.jp/form.html>) 对 LDH 进行亚细胞定位预测分析。

1.5 野桑蚕 LDH 基因的半定量 RT-PCR 分析

以野桑蚕的卵、幼虫、蛹、蛾个体及野桑蚕 5 龄 3 日幼虫的马氏管、中肠、表皮、脂肪体、丝腺、血液、精巢、卵巢的第 1 链 cDNA 为模板, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计的引物(正向引物: 5'-GAT-TATTCTATAACAGCTG-3'; 反向引物: 5'-GTCTTCGATGCCGTGCT-3')进行 PCR 扩增。以家蚕 *Actin3* 基因(正向引物 5'-CAGTATTA-AATAAACAAGATGGA; 反向引物 5'-GATGCATTCGCGTTAGAATTTAA-3')为内参。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 42 s, 53℃ 46 s, 72℃ 32 s, 25 个循环; 72℃ 延伸 10 min。扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 野桑蚕 LDH 基因的克隆

从野桑蚕 5 龄 3 日个体的 cDNA 中克隆得到约 1 200 bp 的单一一条带。测序结果表明, 野桑蚕 LDH 基因的 cDNA 序列全长 1 026 bp(图 1), 含有一个完整的开放阅读框, 长 996 bp, 位于 19~1 014 bp 处, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAA, 编码 331 个氨基酸。

2.2 野桑蚕 LDH 生物信息学分析

LDH 基因只有 1 个外显子, 没有内含子, 其开放阅读框含有 7 个保守的底物结合位点, 用矩形框标明, 分别位于图 1 中的 99、105、137、168、192、237、247

氨基酸残基处。四聚体结合位点,用下划线标明,位于图 1 中的 180、183、185、202、207、264—266、269、296—297、300、302—304 氨基酸残基处。经预测 LDH 蛋白的分子量为 36.35 kD,等电点为 6.76, C-末端有疏水跨膜区域。在 NCBI 上对野桑蚕 LDH

氨基酸序列进行 BLAST 比对分析表明,不同物种 LDH 的氨基酸序列之间有不同程度的一致性,其中与昆虫 LDH 的一致性较高,与家蚕 LDH1(NP_001095933.1)的一致性最高为 99%。亚细胞定位预测分析表明,该蛋白主要定位于细胞质中。

```

cagtattaaataaacaagatg gag tcc ctg aag aag ctg ttc cag ccc gtg cac 54
                                M   E   S   L   K   K   L   F   Q   P   V   H 12
gag aag gtg gac gaa act tgg agc aag gtg acc att gtc ggg gtc ggt cag105
E   K   V   D   E   T   W   S   K   V   T   I   V   G   V   G   Q 29
gtt ggg atg gcc gca gcg ttc tct atg ctg acg cag aat gtt acg aat aac156
V   G   M   A   A   A   F   S   M   L   T   Q   N   V   T   N   N 46
atc gct cta gta gac atg atg gct gac aaa ttc aaa gga gag atg atg gac207
I   A   L   V   D   M   M   A   D   K   L   K   G   E   M   M   D 63
ctg cag cac gga tca gca ttc atg agg aac gcc aag atc caa tct agt acg258
L   Q   H   G   S   A   F   M   R   N   A   K   I   Q   S   S   T 80
gat tat tct ata aca gct ggc tcg aag atc tgc gtg gtt act gct ggt gtt309
D   Y   S   I   T   A   G   S   K   I   C   V   V   T   A   G   V 97
cga caa cgc gaa ggt gaa tct cgt ctc gat ctc gtg cag aga aac acc gat360
R   Q   R   E   G   E   S   R   L   D   L   V   Q   R   N   T   D 114
gtg ctt aaa caa ata atc ccg cag ctg ata aag tac agt ccg gac aca ata411
V   L   K   Q   I   I   P   Q   L   I   K   Y   S   P   D   T   I 131
ttg gtg atc gcc agt aac ccc gtg gat att ctc acg tat gtt acg tgg aag462
L   V   I   A   S   N   P   V   D   I   L   T   Y   V   T   W   K 148
att agc ggg ctg cct aag cac cgc gtc atc ggg tcc ggc act aac ttg gac513
I   S   G   L   P   K   H   R   V   I   G   S   G   T   N   L   D 165
tcg gca cgg ttc cgt tac ctc ctg tcg gac agg ctc ggt atc gct acc acg564
S   A   R   F   R   Y   L   L   S   D   R   L   G   I   A   T   T 182
tcc tgc cac ggc tac atc atc ggc gaa cac gga gac agc agc gtt cca gta615
S   C   H   G   Y   I   I   G   E   H   G   D   S   S   V   P   V 199
tgg tct gca gta aac ata gcg gga gta cgc ctc agt gat ctc aac aat cag666
W   S   A   V   N   I   A   G   V   R   L   S   D   L   N   N   Q 216
atc gga acc gac gac gat cct gag aac tgg aag gag ctt cac gag aat gtc717
I   G   T   D   D   D   P   E   N   W   K   E   L   H   E   N   V 233
gtg aaa agt gct tac gaa gtg atc aaa ctg aag gga tac act tcc tgg gct768
V   K   S   A   Y   E   V   I   K   L   K   G   Y   T   S   W   A 250
atc gga ctg tcg ctg gct cag atc gtg agg gct ata ctc acg aac gct aac819
I   G   L   S   L   A   Q   I   V   R   A   I   L   T   N   A   N 267
agc gtt cat gcg gtc tct act tat ctc aag ggc gag cac ggc atc gaa gac870
S   V   H   A   V   S   T   Y   L   K   G   E   H   G   I   E   D 284
gat gta ttc tta tcg ctg ccg tgc gtg ttg agt cac tgt gga gtc tct gac921
D   V   F   L   S   L   P   C   V   L   S   H   C   G   V   S   D 301
gtc atc cgc cag cct cta acc gaa ctt gaa gtg gca cag ctt cgg aaa tct972
V   I   R   Q   P   L   T   E   L   E   V   A   Q   L   R   K   S 318
gct aaa gtc atg gct aaa gtg cag aac gac att aaa ttc taacgcgaatgcatc1026
A   K   V   M   A   K   V   Q   N   D   I   K   F   * 331

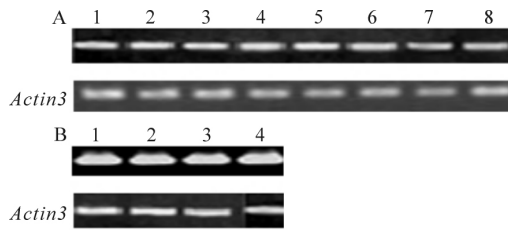
```

图 1 野桑蚕 LDH 基因的编码区及推导的氨基酸序列

2.3 野桑蚕 LDH 基因的表达分析

由图 2A 可以看出,在野桑蚕 5 龄 3 日幼虫的马氏管、中肠、表皮、脂肪体、丝腺、血液、卵巢、精巢中 LDH

基因表达量均较高,且无明显差异。由图 2B 可以看出,LDH 基因在野桑蚕卵、幼虫、蛹、蛾个体中均表达,且表达量较高,各个发育时期表达量基本趋于一致。



A1. 脂肪体; A2. 中肠; A3. 表皮; A4. 丝腺; A5. 马氏管;
A6. 血液; A7. 精巢; A8. 卵巢; B1. 卵; B2. 幼虫;
B3. 蛹; B4. 蛾

图 2 野桑蚕 *LDH* 基因 mRNA 在不同组织(A)及发育时期个体(B)中的表达情况

3 结论与讨论

本研究采用 RT-PCR 技术获得了野桑蚕 *LDH* 基因的 cDNA 序列,并对其序列结构及表达谱进行了分析,为进一步研究野桑蚕 *LDH* 基因的功能提供了重要的资料。

研究^[11-13]表明,大多数物种包括果蝇、大红斑蝶、埃及伊蚊、熊蜂、家蚕、人类、家豚鼠等的 *LDH* 基因都有高度保守的底物结合位点和四聚体结合位点,本研究得到了相同的结果。在 NCBI 上对氨基酸序列进行 BLAST 同源性比对分析表明,本研究获得的野桑蚕 *LDH* 氨基酸序列与昆虫 *LDH* 的一致性较高,与家蚕 *LDH1* 的一致性最高,表明本研究得到的为野桑蚕 *LDH1* 基因,而在野桑蚕中是否还存在其他的同工酶类型,有待于进一步探讨。

转录表达谱检测结果表明野桑蚕 *LDH* 基因在所检测的不同组织及不同的发育时期个体中均有表达,且表达量基本趋于一致,表明 *LDH* 基因在野桑蚕的生长发育中可能具有重要作用。

参考文献:

[1] Whitt G S. Genetic, developmental and evolutionary aspects of the lactate dehydrogenase isozyme system[J]. Cell Biochem Funct, 1984, 2(3): 134-139.

[2] Ferrer S, Tunon I, Marti S, *et al.* A theoretical analysis of rate constants and kinetic isotope effects corresponding to different reactant valleys in lactate dehydrogenase[J]. J Am Chem Soc, 2006, 128: 16851-16863.

[3] Ellington A D, Bull J J. Evolution: Changing the cofactor diet of an enzyme[J]. Science, 2005, 310: 454-455.

[4] Maekawa M. Lactate dehydrogenase isoenzymes[J]. J Chromatogr, 1988, 429: 373-398.

[5] Li S S. Human and mouse lactate dehydrogenase genes A (muscle), B (heart), and C (testis): Protein structure, genomic organization, regulation of expression, and molecular evolution[J]. Prog Clin Biol Res, 1990, 344: 75-99.

[6] 洪键, 贺庆华. 黄牛睾丸特异乳酸脱氢酶-C 基因选择性剪接体的克隆与序列分析[J]. 华北农学报, 2009, 24(3): 51-53.

[7] 郑玉才, 赵兴波, 周静, 等. 牦牛乳酸脱氢酶 B 基因突变体的克隆鉴定研究[J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2008, 38(2): 131-135.

[8] 李剑, 唐云, 梁凤来, 等. D-乳酸脱氢酶基因克隆及其表达[J]. 微生物学报, 2004, 44(4): 491-495.

[9] 杜武英, 黄江, 胡旭初, 等. 猪带绦虫乳酸脱氢酶基因的序列分析、克隆表达和免疫学分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(3): 246-251.

[10] 梅眉, 黄永红, 茆振川, 等. 南方根结线虫乳酸脱氢酶基因克隆及其沉默效应分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(16): 3384-3391.

[11] Tsukamoto M, Horio M. Electrophoretic comparison of the lactate dehydrogenase banding pattern among Japanese mosquito larvae[J]. J Med Entomol, 1985, 22(5): 491-498.

[12] Karvountzi E, Kiliass G, Alahiotis S N. Drosophila lactate dehydrogenase: Functional and evolutionary aspects[J]. Hereditas, 1995, 123(1): 61-67.

[13] Alahiotis S N, Onoufriou A, Fotaki M, *et al.* Drosophila lactate dehydrogenase: Developmental aspects[J]. Biochem Genet, 1983, 21(2): 199-211.