

草鱼 Annexin A4 基因克隆、表达特性及进化

吴初新 马梅生 王丽坤 胡成钰*

(南昌大学生命科学与食品工程学院 南昌 330031)

摘要: 草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) Annexin A4 基因克隆于肝肾 cDNA 文库, 该 cDNA 全长为 1 307 bp, 其中 5' 非编码区为 104 bp, 3' 非编码区为 237 bp, 开放阅读框为 966 bp, 编码 321 个氨基酸。草鱼 Annexin A4 编码的蛋白质 N 端由 15 个氨基酸残基组成, C 端具有 4 个重复序列, 每个重复序列都有一个型钙结合位点, 在第 4 个钙结合位点中包含一个“KGD”序列。Annexin A4 在草鱼肝、肾、脾、心、鳃、肠中的表达量均较高, 而肌肉和脑中不表达; P₁₂:C 诱导后, 其表达均有所下调。系统发育树显示, 草鱼 Annexin A4 与斑马鱼 (*Danio rerio*) 的进化距离最近。适应性进化分析没有检测到正选择位点, 表明 Annexin A4 非常保守, 受到强烈的功能约束。

关键词: 膜联蛋白 A4; 表达; 适应性进化; P₁₂:C; 草鱼

中图分类号: Q172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)04-08-06

Cloning, Tissue-Specific Expression and Evolutional Analysis of Grass Carp Annexin A4 Gene

WU Chur-Xin MA Mei-Sheng WANG Li-Kun HU Cheng-Yu*

(College of Life Sciences and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: The Annexin A4 gene was cloned from the Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) liver and kidney cDNA library. The full sequence was 1 307 bp, containing a 5' untranslated region of 104 bp and a 3' untranslated region of 237 bp. The open reading frame was 966 bp which could code a 321 amino acids peptide. The Grass Carp Annexin A4 had a tail (N-terminal region) and a core domain (C-terminal region). The N-terminus was composed of 15 residues. The core domain was made up of four similar repeats, each covering a type calcium binding site. And there was a KGD motif in the fourth site. The Grass Carp Annexin A4 had a high expression level in the liver, kidney, spleen, heart, gill and intestine, but its expression was not detected in the muscle and brain. Additionally, down-regulated expression of Annexin A4 was detected in all of the six tissues after Grass Carp was challenged by P₁₂:C. Phylogenetic tree analysis revealed that Grass Carp Annexin A4 shared the highest homology with that of Zebra Fish (*Danio rerio*). Positive selection sites were not detected by adaptive evolutionary analysis, and therefore Annexin A4 might be highly conserved and have strong functional constraint.

Key words: Annexin A4; Expression; Adaptive evolution; P₁₂:C; Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

膜联蛋白 (annexins) 是一类钙依赖性的膜磷脂结合蛋白质, 参与膜转运及膜表面一系列活动, 与囊泡运输、胞吐作用中的膜融合、信号传导和钙离子通道的形成有关。Annexin A 是脊椎动物特有的膜联蛋白, 包含 A1 ~ A11 和 A13 在内的 12 个成员^[1]。Annexin A4 为

基金项目 江西省重点科技攻关项目 (No. 20061B0260301), 江西省教育厅项目 (GJ09057), 江西省研究生创新专项资金项目 (YC08A018);

*通讯作者, E-mail: hucy2008@21cn.com;

第一作者介绍 吴初新, 男, 博士研究生; 研究方向: 动物学; E-mail: chuxin7072@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2008-12-18, 修回日期: 2009-04-25

Annexin A 家族重要成员之一,参与细胞中钙的信号传导、胞吐作用及调控上皮细胞钙活化的氯离子通道活性^[2]。*Annexin A4* 结构非常保守,其 C 端为核心区,由 4 个同源的重重复序列(~)组成,每个重复序列含有 5 个螺旋,其中的 4 个(ABDE)几乎呈平行排列,捆绑成束状,而第 5 个螺旋(C)则与束状结构几乎垂直。在每个重复序列中都具有“GkGF-x38-D/E”模体,形成型钙离子结合位点。N 端为尾区,是 *Annexin A4* 的调节区^[3,4]。

目前,已在人(*Homo sapiens*)^[5]和小鼠(*Mus musculus*)^[6]、牛(*Bos taurus*)^[7]、爪蟾(*Xenopus laevis*)^[2]等多种动物中克隆和鉴定了 *Annexin A4* 基因,并进行了相关的功能研究。对于鱼类 *Annexin A4* 研究不多,仅见于斑马鱼(*Danio rerio*)^[8]和青鳉(*Oryzias latipes*)^[9]中有部分序列的报道。本实验通过筛选草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肝肾 cDNA 文库,克隆和鉴定了草鱼 *Annexin A4*(FJ428216)基因,并在此基础上对其表达特征和适应性进化进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料 草鱼肝肾 cDNA 文库(载体为 pBluescript SK,宿主菌为 DH5)由本实验室保存。实验用草鱼是由江西省水产科学研究所提供,体重约 20 g,共 20 尾。于流水实验槽中暂养一周后,进行分组,分别为对照组和 P₁ :C (Amersham Biosciences 公司产品)诱导组,诱导剂量为每尾注射 1 mg/ml P₁ :C 500 μ l,诱导时间 72 h。

1.2 草鱼 *Annexin A4* 基因的克隆 采用 pBluescript SK 载体上的通用引物:M13u (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3')和 T3 (5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GAA-3'),筛选草鱼肝肾 cDNA 文库。反应体系为 25 μ l:水 18.75 μ l, 10 \times PCR 反应缓冲液 2.5 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 1 μ l, 10 μ mol/ml 引物各 0.5 μ l, 菌液 1.5 μ l, *Taq* 酶 1.25 U。PCR 反应条件:预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min; 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 59 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环;延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.3 草鱼 *Annexin A4* 的分子特征分析 使用 ORF finder、SMART 等在线软件对草鱼 *Annexin A4* 的开放阅读框、功能结构域等进行推译和预测,确定其性质和相关信息。

1.4 草鱼 *Annexin A4* 的组织表达 用 SV Total RNA Isolation system 总 RNA 抽提试剂盒 (Promega 公司产品)分别提取对照组和经 P₁ :C 诱导组草鱼肝、肾、肌肉、脾、心、脑、鳃、肠 8 种组织的总 RNA。Reverse Transcriptase M-MLV 反转录酶(宝生物工程有限公司)反转录得到 cDNA。Northern blot 采用地高辛标记的检测试剂盒(深圳依诺金公司)。

RT-PCR:特异性引物分别为 F1 (5'-CGC CGA AAG ACT CTA CAA GTC-3'), R1 (5'-GAG GGC TGG TGT GAG AGA G-3'), 扩增目的片段长度为 262 bp。以 *-actin* 为内参。*-actin*-F (5'-CAC TGT GCC CAT CTA CGA G-3'), *-actin*-R (5'-CCA TCT CCT GCT CGA AGT C-3')。PCR 反应体系为 25 μ l:10 \times PCR 反应缓冲液 2.5 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ l, 10 μ mol/ml 引物各 0.5 μ l, *Taq* 酶 1.25 U, 根据 *-actin* 调整 cDNA 模板量。反应条件:预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min; 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 58 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 28 个循环; 延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。

Northern blot:地高辛标记探针引物分别为 F2 (5'-TGG GAA AGG AAC TGG TTG AC-3'), R2 (5'-TCT CCG CAG ACA TCA TCC TC-3'), 扩增片段长度为 250 bp。PCR 反应体系为 20 μ l:10 \times PCR 反应缓冲液 2 μ l, MgCl₂ 2 μ l, Dig-dUTP 2 μ l, 10 μ mol/ml 引物各 0.5 μ l, *Taq* 酶 0.5 μ l, cDNA 模板 2 μ l。PCR 反应条件:预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min; 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 58 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环;延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。根据地高辛杂交检测试剂盒的方法进行预杂交、杂交、洗膜和检测。

1.5 适应性进化 从 GenBank 数据库检索到 *Annexin A* 家族 12 个成员的 53 个序列。经 Clustal W 比对,通过 PHYLIP3.67 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) 构建进化树。根据序列对位排列和系统树结果,

根据 cDNA 序列所推导的草鱼 *Annexin A4* 分子量计算值为 35.58 ku,理论等电点为 6.19。草鱼 *Annexin A4* 的 N 端(尾区)由 15 个氨基酸残基组成,其后为 C 端(核心区),具有 4 个重复序列。其中,第 33~85 氨基酸残基、第 105~157 氨基酸残基、第 189~241 氨基酸残基及第 264~316 氨基酸残基分别为这 4 个重复序列中

的 E 型钙结合位点(G>F-x38-D/E),在第 4 个钙结合位点中具有“KCD”序列。

2.3 草鱼 *Annexin A4* 基因的组织表达 P₀ly :C 诱导前,草鱼 *Annexin A4* 在肝、肾、脾、心、鳃、肠 6 种组织中均有表达,而在肌肉和脑中无表达(图 3a、d),经 P₀ly :C 诱导后,*Annexin A4* 在上述组织中的表达均有下调(图 3b、e)。

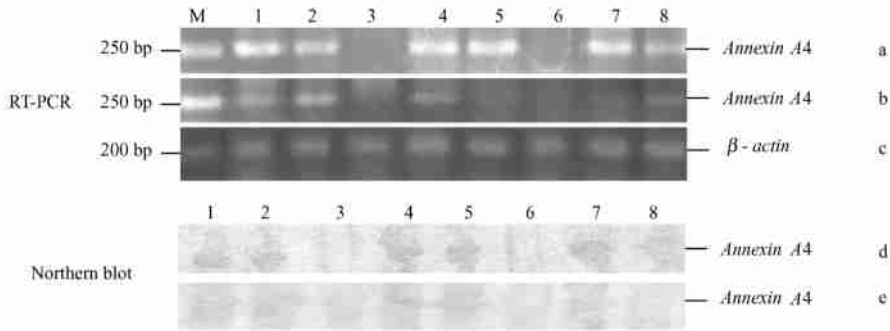


图 3 RT-PCR 和 Northern blot 检测草鱼 *Annexin A4* 的组织表达

Fig. 3 Tissue-specific expression of Grass Carp *Annexin A4* revealed by RT-PCR and Northern blot

a 和 d 为对照组;b 和 e 为 P₀ly :C 诱导组;RT-PCR 以 β -actin 转录水平平衡模板 cDNA 浓度(c)。泳道 1~8 分别为肝、肾、肌肉、脾、心、脑、鳃、肠。M 为 DNA 分子量标准。

Annexin A4 expression was analyzed by RT-PCR and Northern blot. Both b and e were infected by P₀ly :C, while a and d were control. RT-PCR samples were normalized on the basis of β -actin expression(c). Lanes 1-8 represent liver, kidney, muscle, spleen, heart, brain, gill and intestine respectively. M was DNA Marker.

2.3 草鱼 *Annexin A4* 分子适应性进化分析

2.3.1 *Annexin A4* 的系统发生 利用 PHYLIPY 构建 *Annexin A* 系统发生树(图 4)。系统树明显地分为 12 大簇,草鱼 *Annexin A4* 位于与人、鼠等物种 *Annexin A4* 相同的进化枝上,与斑马鱼的关系最近。

2.3.2 *Annexin A4* 适应性进化分析 适应性进化分析的结果显示(表 1),虽然 M3 & M0 的 χ^2 检验极显著(1%水平,自由度 $df = 5 - 1 = 4$,似

然值 1.066.094.6 远大于 χ^2 值 13.276),但 M8 & M7 的 χ^2 检验极不显著,且在 M3、M8 模型中都没有找到 $\omega > 1$ 的位点,表明 *Annexin A4* 没有受到正选择作用,而是处于中性进化或负进化状态。模型 M8 的参数 $p_0 = 1.000$,表示受到选择约束的位点的比例,从另一方面说明 *Annexin A4* 受到功能或结构上的选择约束,其序列在进化上的高度保守。

表 1 *Annexin A4* 正选择的似然比检验

Table 1 Likelihood ratio test of positive selection for *Annexin A4*

模型 M ₀ d	似然值对数 lnL	参数估计 Estimates of parameters	两倍的似然值对数差 2 lnL	正选择位点 Positively selected sites
M ₀	- 26 768.085 6	$\omega = 0.077 0$	1 066.094 6**	无 None
M ₃	- 26 235.038 3	$p_0 = 0.219 0, p_1 = 0.419 8, p_2 = 0.361 2$ $q_0 = 0.010 1, q_1 = 0.053 8, q_2 = 0.155 7$		无 None
M ₇	- 14 329.940 8	$p = 0.900 0, q = 9.123 7$	- 0.000 8	无 None
M ₈	- 14 329.941 2	$p_0 = 1.000 0, p = 0.900 0, q = 9.123 7$ ($p_1 = 0.000 0$), $\omega = 3.732 6$		无 None

lnL 是最大似然值的对数; 2 lnL 是 M₃ & M₀、M₈ & M₇ 间 lnL 之差的二倍; **表示似然比检验显著。

lnL :the log-likelihood. 2 lnL :twice of the log-likelihood difference. **:significant at 1% level.

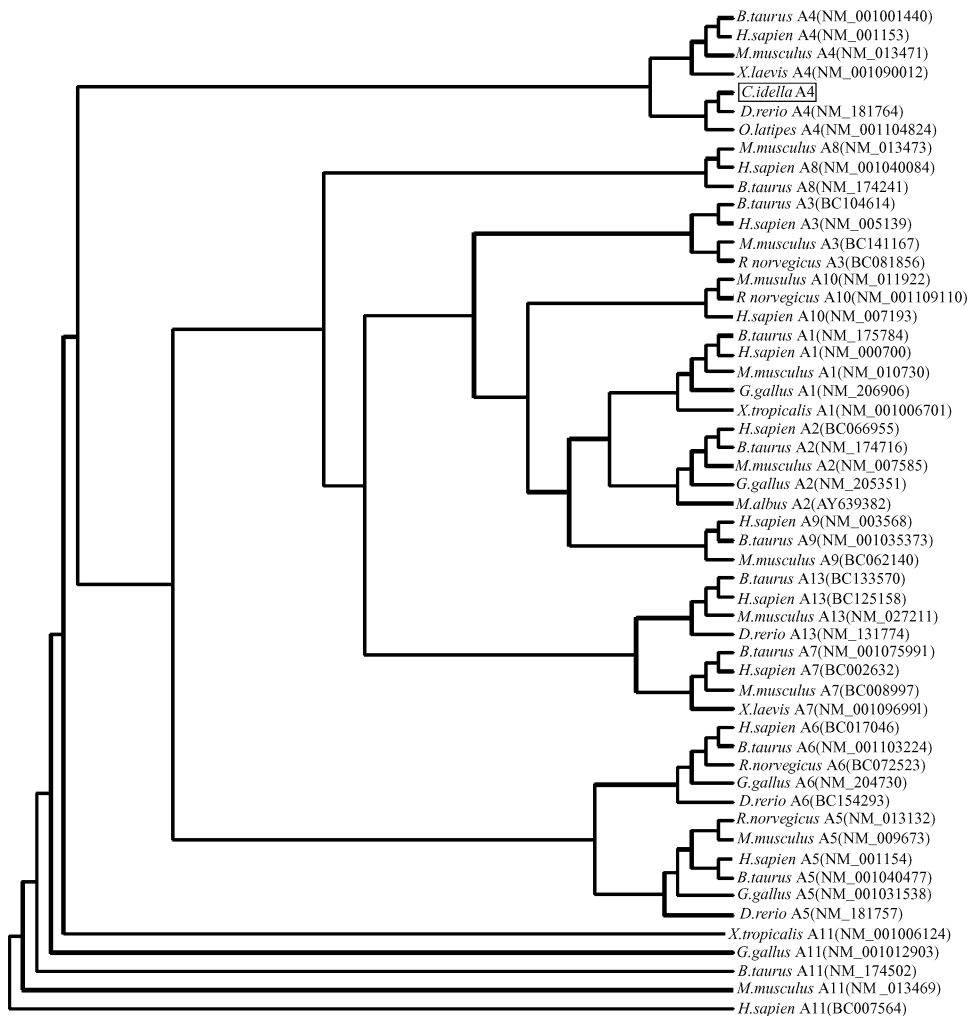


图 4 Annexin A 系统发生树

Fig. 4 Phylogenetic tree of Annexin A

D. rerio: 斑马鱼; *M. musculus*: 小鼠; *H. sapiens*: 人; *B. taurus*: 牛; *X. laevis*: 爪蟾; *M. albus*: 黄鳝; *G. gallus*: 鸡; *X. tropicalis*: 爪蟾; *R. norvegicus*: 大鼠; *O. latipes*: 青鳉。括号中为 GenBank 序列号。方框为草鱼 (*C. idella*) Annexin A4。A1 ~ A11 及 A13 分别表示 Annexin A1 ~ Annexin A11 和 Annexin A13。

D. rerio: *Danio rerio*; *M. musculus*: *Mus musculus*; *H. sapiens*: *Homo sapiens*; *B. taurus*: *Bos taurus*; *X. laevis*: *Xenopus laevis*; *M. albus*: *Monopterus albus*; *G. gallus*: *Gallus gallus*; *X. tropicalis*: *Xenopus tropicalis*; *R. norvegicus*: *Rattus norvegicus*; *O. latipes*: *Oryzias latipes*. The accession numbers of GenBank in the brackets, the pane indicated Annexin A4 of *C. idella*. A1 - A11 and A13 represented Annexin A1 - Annexin A11 and Annexin A13 respectively.

3 讨论

N 端序列长短可能是区别 Annexin A 家族成员的分子特征。如 A1、A4、A5、A6、A10、A12 的 N 端长度只有 11 ~ 19 个氨基酸残基, 斑马鱼^[8]、青鳉^[9]和本文报道的草鱼的 Annexin A4 的 N 端由 15 个氨基酸残基组成, 而 A7 和 A11

的长度甚至大于 100 个氨基酸残基^[10]。草鱼 Annexin A4 具有典型的“R/K/HGD”特征域(KGD), 位于第 4 个重复序列的型钙结合位点中。“KGD”结构域与细胞外基质竞争结合细胞膜表面的多种整合素受体, 抑制整联蛋白与配体的相互作用, 具有促进细胞凋亡等功能^[11]。构建的系统发生树显示, Annexin A 家族

各成员明显地聚类为 12 大簇,各自独立,这在某种意义上反映每种 Annexin A 功能的重要性及进化的保守程度。草鱼 Annexin A4 与斑马鱼的具有 93% 的同源性,与人的有 64% 的同源性(比对图未给出)。适应性进化分析表明在 Annexin A4 上没有正选择位点。因此,其结构和功能具有很高的保守性。

作为一个重要的功能基因,在细胞中, *Annexin A4* 拥有一种以上的剪切体。如 *Annexin A4* 具有 3 种剪切体基因 *A4a*、*A4b* 和 *A4c*,这 3 种基因在表达时序上有很大的不同^[12]。其中,*A4a* 最为丰富,在大肠、小肠中表达量最高,其次是在肾、胃中,最少是在心、肝、肺中,而 *A4b* 仅在消化道有高表达,*A4c* 则在肾、肝、消化道有低水平表达^[12]。在 GenBank 中,斑马鱼 *Annexin A4* 也有 3 个大小不同的序列,分别为 3 171 bp (NM_181764)、1 268 bp (AY178798)、1 265 bp (BC153609),它们编码相同的蛋白质(321 aa)。草鱼 *Annexin A4* 与斑马鱼的 AY178798 和 BC153609 大小相似,但与 NM_181764 有很大的差别。而且,草鱼 *Annexin A4* 的组织表达特性似乎与小鼠 *Annexin A4a*、*A4b* 和 *A4c* 的都不相同。因此,本文报道的草鱼 *Annexin A4* 属何种类型有待进一步的研究,且需要其他鱼类的相关报道才能予以确定。

作为一种膜磷脂结合的蛋白质,Annexin A 可能是病毒侵袭脊椎动物细胞的门户。例如 Annexin A2 作为人巨细胞病毒(HCMV)受体,可促使 HCMV 与磷脂膜的结合与融合^[13]。Annexin A5 能与人乙肝病毒(HBV)小 HbsAg 结合,由此,病毒接近由 Annexin A5 介导的融合后的细胞,导致真正的入侵^[14]。虽然 Annexin A4 与病毒侵染的关系还未见报道,但草鱼经 Poly I:C 诱导后,*Annexin A4* 在肝、肾、脾、心、鳃、肠 6 种组织中的表达均有所下调。草鱼 *Annexin A4* 的这种诱导下调,是否与病毒入侵或机体抗病毒有关,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Gerke V, Moss S E. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*, 2002, **82**(2): 331 ~ 371.
- [2] Seville R A, Nijjar S, Barnett M W, et al. Annexin IV (Xanx-4) has a functional role in the formation of pronephric tubules. *Development*, 2002, **129**: 1 693 ~ 1 704.
- [3] Moss S E, Morgan R O. The annexins. *Genome Biology*, 2004, **5**: 219 ~ 226.
- [4] Liemann S, Huber R. Three-dimensional structure of annexins. *Cell Mol Life Sci*, 1997, **53**(6): 516 ~ 521.
- [5] Hauptmann R, Maurer-Fogy I, Krystek E, et al. Vascular anticoagulant beta: a novel human Ca²⁺/phospholipid binding protein that inhibits coagulation and phospholipase A2 activity. Its molecular cloning, expression and comparison with VAC-alpha. *Eur J Biochem*, 1989, **185**(1): 63 ~ 71.
- [6] Sable C L, Riches D W. Cloning and functional activity of a novel truncated form of annexin IV in mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **258**(1): 162 ~ 167.
- [7] Harhay G P, Sonstegard T S, Keele J W. Characterization of 954 bovine full-CDS cDNA sequences. *BMC Genomics*, 2005, **6**: 166.
- [8] Farber S A, De Rose R A, Olson E S, et al. The zebrafish annexin gene family. *Genome Res*, 2003, **13**: 1 082 ~ 1 096.
- [9] Osterloh D, Wittbrodt J, Gerke V. Characterization and developmentally regulated expression of four annexins in the killifish medaka. *DNA Cell Biol*, 1998, **17**(10): 835 ~ 847.
- [10] Gerke V, Moss S E. Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1** 357(2): 129 ~ 154.
- [11] Anuradha C D, Kanno S, Hirano S. RGD peptide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells requires caspase-3 activation. *Cell Biology and Toxicology*, 2004, **16**(5): 275 ~ 283.
- [12] Li B, Dedman J R, Kaetzel M A. Intron disruption of the annexin IV gene reveals novel transcripts. *J Biol Chem*, 2003, **278**(44): 43 276 ~ 43 283.
- [13] Wright J F, Kurosky A, Pryzdial E L, et al. Host cellular annexin is associated with cytomegalovirus particles isolated from cultured human fibroblasts. *J Virol*, 1995, **69**(8): 4 784 ~ 4 791.
- [14] Hertogs K, Leenders W, Depla E, et al. Endonexin, present on human liver plasma membranes, is a specific binding protein of small hepatitis B virus (HBV) envelope protein. *Virology*, 1993, **197**(2): 549 ~ 557.