

动物科学

亚洲黑熊四川亚种(*Ursus thibetanus mupinensis*) 线粒体 ATP 合酶和亚基基因克隆及序列分析*

郝彦哲,杜玉杰,吴夏,张田,侯万儒
(西华师范大学 生命科学学院,四川南充 637002)

摘要 根据已报道的部分哺乳动物线粒体 ATP 合酶 F_0 亚基的相关信息设计引物,运用 PCR 技术,首次从亚洲黑熊四川亚种(*Ursus thibetanus mupinensis*)的肌肉组织总 DNA 中成功克隆了线粒体 ATP 合酶 F_0 亚基 8(ATP8)和亚基 6(ATP6)的序列,并对其进行了初步分析。结果表明:PCR 扩增产物的总长度为 942 bp,其中 842 bp 为四川黑熊 ATP8 和 ATP6 基因的编码区。ATP8 和 ATP6 基因存在一段长 43 bp 的重叠区域。ATP8 基因长 204 bp,编码 67 个氨基酸残基的蛋白质,其蛋白分子质量为 7.9 KD,等电点为 10.35;ATP6 基因长 682 bp,编码 226 个氨基酸残基的蛋白质,其蛋白分子质量为 24.8 KD,等电点为 10.63。四川黑熊线粒体 ATP 合酶 F_0 亚基 8 和亚基 6 与其他已报道的部分哺乳动物具有很高的同源性。以基因序列为数据构建的进化树表明四川黑熊和美洲黑熊的亲缘关系最近。本研究为在分子水平上探究黑熊线粒体基因组的遗传特点,探究物种进化关系和物种多样性提供了科学参考。

关键词 亚洲黑熊亚种;线粒体;ATP 合酶;亚基;基因克隆;四川

中图分类号:Q959.838;Q343.1⁺7

文献标识码:A

文章编号:1672-6693(2008)01-0020-05

亚洲黑熊又称为月牙熊、月熊、狗熊(*Ursus thibetanus*),主要分布于俄罗斯、印度、尼泊尔、日本、朝鲜、阿富汗和中国。亚洲黑熊在我国有 5 个地理亚种,即指名亚种(西藏黑熊)(*Ursus thibetanus thibetanus*)、长毛亚种(喜峰黑熊)(*Ursus thibetanus laniger*)、四川亚种(*Ursus thibetanus mupinensis*)、台湾亚种(*Ursus thibetanus formosanus*)和东北亚种(*Ursus thibetanus ussuricus*)^[1]。关于黑熊分子方面的研究国外开展较早,但多集中在北美熊类线粒体基因组^[2-4];而国内有关黑熊的研究主要集中在形态学、行为学与生态学等宏观领域^[5-7],分子方面的研究并不多见^[8-9]。

线粒体中的氧化磷酸化作用是在 5 种复合物(复合物 I,复合物 II,复合物 III,复合物 IV 和复合物 V)催化下实现的。复合物 V 即为 ATP 合酶,ATP 合酶由 F_1 和 F_0 两部分组成,其中 F_1 由核基因编码,为该酶的活性中心; F_0 由两个亚基组成,受线粒体基因编码,即 ATP8 基因编码亚基 8(ATP8)和 ATP6 基因编码亚基 6(ATP6)。对 13 个线粒体基因所编码蛋白的研究表明,ATP6 在线粒体基因组编码

的蛋白中具有最高的变异性^[10]。本实验以四川境内的亚洲黑熊四川亚种(以下简称四川黑熊)为对象,首次克隆得到了 ATP8 和 ATP6 的基因序列并分析了其序列特征,同时结合研究结果探讨了四川黑熊与美洲黑熊、棕熊、北极熊、牛、狗和大鼠间系统发生与演化上的关系,为从分子水平上探究黑熊线粒体基因组的遗传特点,探究物种进化关系和物种多样性等方面提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

所用材料为四川黑熊肌肉组织,取自四川省中药材公司都江堰鹿场圈养的黑熊(6 头雌性四川黑熊和 6 头雄性四川黑熊的肌肉组织样品)。将所取材料保存于 70% 酒精溶液中。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 用 Masuda 和 Yoshida 改进过的蛋白酶 K/苯酚/氯仿常规抽提法^[11](抽提 DNA 所用药品均购自成都天泰生命科技有限公司),即蛋白酶 K 消化、饱和酚-氯仿萃取、乙醇沉淀、TE 溶

* 收稿日期 2007-09-04

资助项目 国家自然科学基金项目(No. 30470261);四川省教育厅重点科研项目(No. 402044);西华师范大学科研启动项目(2003);四川省重点学科建设项目(No. SZD0420)

作者简介 郝彦哲(1983-)男,山东菏泽人,硕士研究生,研究方向为生物化学与分子生物学。

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 °C 保存备用。

1.2.2 引物设计 根据已报道的美洲黑熊、棕熊和北极熊的 ATP8 和 ATP6 基因序列,设计扩增四川黑熊的 ATP8 和 ATP6 基因的引物:上游引物 5'-CCT-CAATACTATAAAAATCATTGA-3';下游引物 5'-GTTT-GGTGAGTCATTAGGTGTTAT-3'。

1.2.3 基因的扩增、克隆及测序 采用 50 μ L PCR 反应体系:MgCl₂(2.5 mMol)3 μ L,dNTPs(2.5 mMol)4 μ L,10 \times PCR Buffer 5 μ L,rTaq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.25 μ L,DNA 提取物 2 μ L,上下游引物各 1 μ L,用灭菌双蒸水补充终体积至 50 μ L。所用 PCR 仪为德国 Eppendorf 公司产的 Master Cycler。反应条件 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 40 sec,50 °C 退火 30 sec,72 °C 延伸 1 min,30 个循环,72 °C 10 min,4 °C 保存。1.0% 琼脂糖凝胶检测 PCR 产物,用 GEL Doc™ EQ 全自动凝胶成像分析系统记录结果。

用 Omega 公司生产的 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 对 PCR 产物进行回收纯化,将回收产物与 pMD18-T 载体(Takara 公司产品)16 °C 连接过夜,常规方法转化 E. coli JM109 感受态细胞,再于含氨苄青霉素的平板上生长过夜,筛选转化子,用煮沸法提取质粒,以质粒 DNA 为模板,采用通用引物 M13 进行 PCR 扩增,检测克隆结果。选取 3 个经鉴定的阳性重组质粒在 AB 3700 型测序仪上进行测序。

1.3 数据处理

采用 GenScan 软件(<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>)对 DNA 序列进行预测。采用 Blast2.1 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)进行序列的相似性比较。采用 Clustalw 软件(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)进行多重序列比较。以 7 个物种的 ATP8 和 ATP6 两个基因的序列结构为数据,利用 MEGA 3.1 软件,以 Neighbor-Joining 法和 UPGMA 法构建进化树。利用 ExPASy Proteomics Server 的软件(<http://au.expasy.org>)和 Proteomics Server 软件(<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>)对 ATP8 及 ATP6 蛋白的生化特性、蛋白质结构域和功能位点进行预测和分析。

2 结果

2.1 PCR 产物

PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分离,可见清晰的特异性扩增条带(图 1)。将 PCR 扩增产物测序,测得序列长度为 942 bp,与预期大小一致。



图 1 四川黑熊 ATP8 和 ATP6 基因总扩增产物
Fig. 1 The PCR Amplification Result of ATP6 and ATP8 Gene of *Ursus thibetanus mupinensis*
1. PCR Amplification Result; 2. Blank Comparison

2.2 序列分析结果

作者已向 GeneBank 数据库提交了该序列,登记号为 DQ402478。对 PCR 产物序列分析表明:PCR 扩增产物为 942 bp,包含四川黑熊 ATP8 及 ATP6 基因,其中编码区长 842 bp。ATP8 基因的 3' 端与 ATP6 基因的 5' 端存在长 43 bp 的重叠区域;ATP8 基因长度为 204 bp,GC 含量为 34.3%,编码 67 个氨基酸残基;ATP6 基因长度为 682 bp,GC 含量为 46.1%,编码 226 个氨基酸残基。四川黑熊 ATP8 及 ATP6 基因的起始密码子和终止密码子均分别为“ATG”和“TAA”。

2.3 蛋白质生化特性和功能位点预测结果

蛋白生化特性预测结果表明:四川黑熊的 ATP8 蛋白和 ATP6 蛋白的分子量分别是 7.9 KD 和 24.8 KD,其等电点分别是 10.35 和 10.6。

拓扑结构预测结果表明:四川黑熊的 ATP8 蛋白含有 1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(图 2a)。ATP6 蛋白含有 1 个 ATP 合酶亚基 a 标记,2 个 N-十四酸化位点,2 个 N-糖基化位点,1 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点和 1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(图 2b)。

2.4 进化树的构建

以四川黑熊、美洲黑熊、棕熊、北极熊、牛、狗和大鼠的 ATP8 和 ATP6 基因的序列为数据,用最小进化法(minimum evolution)和非加权分组平均法(UPGMA)两种方法分别构建进化树(图 3a,图 3b)。

3 讨论

将四川黑熊的 ATP8 和 ATP6 基因与美洲黑熊、棕熊、北极熊、牛、狗及大鼠相应基因进行对比发现:四川黑熊与棕熊的 GC 含量最为接近,分别为 43.5% 和 44.0%,在牛、狗及大鼠中,四川黑熊与狗的 GC 含量最为接近,分别为 43.5% 和 42.1%。它



图 2a 四川黑熊等 7 种动物的 ATP8 蛋白的功能位点预测结果

Fig. 2a The Result of Predicted Intra-domain Features of ATP8 Protein for Asian Black Bear Sichuan Subspecies and Other 6 Species

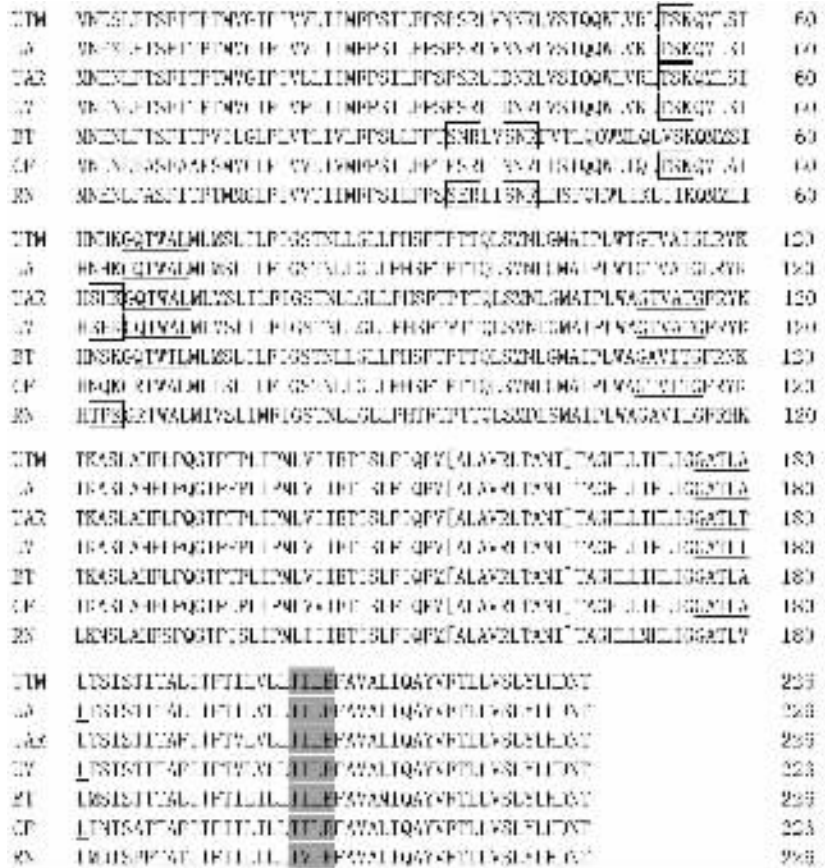


图 2b 四川黑熊等 7 种动物的 ATP6 蛋白的功能位点预测结果

Fig. 2b The Result of Predicted Intra-domain Features of ATP6 Protein for Asian Black Bear Sichuan Subspecies and Other 6 Species

注 UTM-亚洲黑熊四川亚种; UA-美洲黑熊; UAR-棕熊; UM-北极熊; BT-牛; CF-犬; RN-大鼠; “_” : N-十四酰化位点; “...” : N-糖基化位点; “■” : 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点; “□” : 蛋白激酶 C 磷酸化位点; “[]” : ATP 合酶亚基 a 标记。

Note: UTM-the Asian black bear Sichuan subspecies; UA-American black bear; UAR-brown bear; UM- polar bear; BT- cow; CF-dog; RN-mouse. “_” : N-myristoylation site; “...” : N-glycosylation site; “■” : Casein kinase II phosphorylation site; “□” : Protein kinase C phosphorylation site [] : ATP synthase a subunit signature.

们 ATP8 和 ATP6 基因的起始密码子均为“ATG”终止密码子均为“TAA”。将四川黑熊的 ATP8 和 ATP6 基因及其编码蛋白的氨基酸序列与以上 6 个物种的相应基因及编码蛋白的氨基酸序列进行相似性比较(表 1), 结果表明这 6 个物种的核酸序列和其所编码蛋白的氨基酸序列都具有很高的相似性, 其中美洲黑熊与四川黑熊的相似性最高。

四川黑熊等 7 种哺乳动物的 ATP8 蛋白的拓扑预测结果(图 2a)表明除牛外其他物种 ATP8 蛋白都含有蛋白激酶 C 磷酸化位点, 但是其他物种的 ATP8 蛋白中都没有牛 ATP8 蛋白所含的酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(位于 49-52)。ATP6 蛋白的拓扑预测结果(图 2b)表明: 四川黑熊和美洲黑熊的 ATP6 蛋白功能位点完全一致, 棕熊和北极熊的 ATP6 蛋白功能位点完全一致, 其他物种间各位点均存在差异。这些结果表明线粒体 ATP6 基因有较快的进化速率。

以四川黑熊等 7 种哺乳动物的 ATP8 和 ATP6 基因的序列为数据, 用最小进化法和非加权分组平均法两种方法构建了进化树(图 3a, 图 3b), 并采用自举(Bootstrap)检验法来评价树中分支的置信度。支上的数值为 2000 次自举检验得到的对该支的支持百分数。从图 3a 和图 3b 来看, 两棵树的拓扑结构一致, 因此认为这两棵树的拓扑结构都是正确的。Minimum evolution 树的美洲黑熊和四川黑熊聚合这一支的自举检验支持率为 62%, UPGMA 树的这一支自举检验支持率为 92%, 且该树中熊类与狗聚合的这一支自举检验支持率为 79%, Kimball et al. 认为, 置信度大于 70% 的进化支才是比较可靠的^[12], 因此可认为 UPGMA 树的这几支数据更可靠一些。因为讨论中不涉及牛和大鼠之间的系统发育关系, 故不考虑这两者聚合的分支的自举检验值, 以 UPGMA 树来进行讨论。图 3b 表明, 在核酸水平上, 这 7 个物种中, 四川黑熊与美洲黑熊的系统发育关系最近。

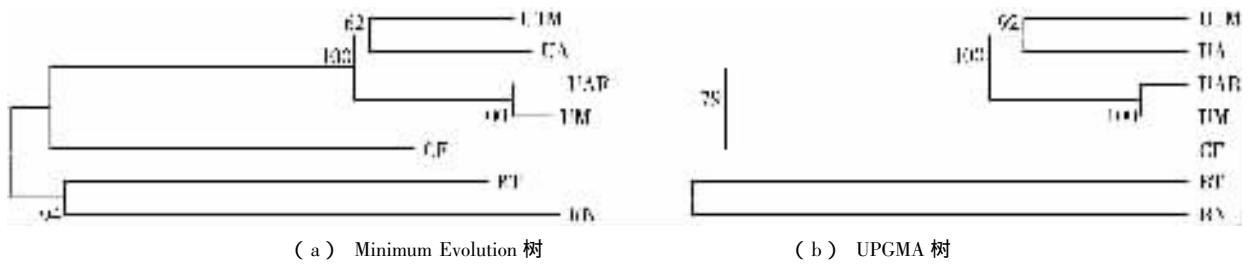


图 3 7 个物种的 ATP8 及 ATP6 基因进化树

Fig. 3 Phylogenetic Tree for Seven Species ATP8 and ATP6 Gene a. by Minimum Evolution Method ; b. by UPGMA Method
注 :UTM-亚洲黑熊四川亚种 ;UA-美洲黑熊 ;UAR-棕熊 ;UM-北极熊 ;BT-牛 ;CF-犬 ;RN-大鼠。支上的数值为 2000 次自举检验得到的对该支的支持百分数。

Note :UTM-the Asian black bear Sichuan subspecies ;UA-American black bear ;UAR-brown bear ;UM-polar bear ;BT-cow ;CF-dog ;RN-mouse.

表 1 四川黑熊与其他 6 个物种的 ATP8 及 ATP6 基因及其编码蛋白的氨基酸序列相似性比较

Table 1 Similarity Comparison of ATP8 and ATP6 from Asian Black Bear Sichuan Subspecies with Other Reported Mammals at the nt and aa Level

| 物种 Species | ATP8 (nt) | ATP8 (aa) | ATP6 (nt) | ATP6 (aa) | GeneBank Accession No. |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------------|
| 美洲黑熊 <i>Ursus americanus</i> | 88.7% | 80.6% | 90.0% | 100% | AF303109 |
| 棕熊 <i>Ursus arctos</i> | 84.8% | 82.1% | 89.1% | 94.3% | AF303110 |
| 北极熊 <i>Ursus maritimus</i> | 84.3% | 83.6% | 88.8% | 94.3% | AF303111 |
| 牛 <i>Bos taurus</i> | 66.7% | 61.2% | 73.9% | 84.5% | AY526085 |
| 狗 <i>Canis familiaris</i> | 69.6% | 62.7% | 78.6% | 87.2% | AY729880 |
| 大鼠 <i>Rattus norvegicus</i> | 69.6% | 59.7% | 70.3% | 78.8% | X14848 |

目前, 科学界对美洲黑熊和亚洲黑熊的分类问题有两种不同的观点, 很多学者同意 Pocock 的意见, 依据鉴别特征上明显的差异, 把二者划分为两个不同的属^[13]。但 G. Allen 认为美洲黑熊与亚洲黑熊有相同的牙齿构造和外部特征, 因而认为美洲黑熊与亚洲黑熊应归于同一属^[14]。另外, 一些化石数据也支持这一观点。根据对亚洲黑熊四川亚种、美洲黑熊、棕熊和北极熊的 ATP8、ATP6 基因序列及其编码蛋白的氨基酸序列的同源性比较及基因进化树的分析结果, 支持将美洲黑熊和亚洲黑熊归于同一属。

本实验首次成功克隆出亚洲黑熊四川亚种的线粒体 ATP8 基因和 ATP6 基因, 并对基因结构及其所编码蛋白的结构特征进行了初步分析, 对黑熊线粒体基因组的遗传特点、物种进化关系的研究和物种多样性的分析具有重要意义。

参考文献:

- [1] 马逸清, 徐利, 胡锦矗. 中国熊类资源数量估计及保护对策[J]. 生命科学研究, 1998, 2(3): 205-212.
- [2] 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.
- [3] WAITS L P. A Comprehensive Molecular Study of the Evolution and Genetic Variation of Bears[D]. Salt Lake City: University of Utah, 1996.
- [4] PAKAU D, STROBECK C. Microsatellite Analysis of Genetic Variation in Black Bear Populations[J]. Mol Ecol, 1994, 3: 489-495.
- [5] 侯万儒, 米志平, 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.
- [6] 侯万儒, 张泽钧, 胡锦矗. 卧龙自然保护区黑熊种群生存力初步分析[J]. 动物学研究, 2001, 22(5): 357-361.
- [7] 侯万儒, 任正隆, 喻小钢, 等. 四川九顶山自然保护区野生黑熊种群生存力初步分析[J]. 西华师范大学学报(自然科学版), 2003, 24(4): 381-385.
- [8] HOU Wan-ru and CHEN Yu. A Complete Mitochondrial Genome Sequence of Asian Black Bear Sichuan Subspecies (*Ursus thibetanus mupinensis*) [J]. Int J Biol Sci, 2007, 3: 85-90.
- [9] 陈瑜, 吴夏, 彭正松, 等. 四川黑熊 ND3、ND4L 和 tRNA^{2Arg}基因的克隆和序列分析[J]. 四川师范大学学报(自然科学版) 2007, 30(3): 398-401.
- [10] MISHMAR D, RUIZ-PESINI E, GOLIK P, et al. Natural Selection Shaped Regional mtDNA Variation in Humans [J]. Proc Nat Acad Sci, 2003, 100: 171-176.

- [11] 吴夏 ,陈瑜 ,彭正松 ,等. 四川黑熊线粒体 12S 和 16S rRNA 基因的克隆及序列分析 [J]. 四川师范大学学报 (自然科学版) 2007 30(3) :402-405.
- [12] KIMBALL R T , BRAUN E L , ZWARTJES P W. A Molecular Phylogeny of the Pheasants and Part-ridges Suggests that These Lineages are not Monophyletic [J]. Mol Phylo-
genet Evol ,1999 ,11 38-54.
- [13] POCKOCK R I. The Fauna of British India , Including Ceylon and Burma , Mammalia (2vols ,Primates and Carnivora only) [M]. London :Taylor and Francis ,1941.
- [14] ALLEN G M. The Mammals of China and Mongolia [J]. Natural History of Central Asia ,1938 ,11(1) 312-489.

Cloning and Sequence Analysis of mtDNA ATP Synthase F₀ Subunit 8 (ATP8) and Subunit 6 (ATP6) Gene from Asian Black Bear Sichuan Subspecies (*Ursus thibetanus mupinensis*)

HAO Yan-zhe , DU Yu-jie , WU Xia , ZHANG Tian , HOU Wan-ru

(College of Life Science , China West Normal University , Nanchong Sichuan 637002 , China)

Abstract Mitochondrial ATP synthase F₀ subunit 8 (ATP8) and subunit 6 (ATP6) gene in muscular tissue of Asian black bear Sichuan subspecies (*Ursus thibetanus mupinensis*) are amplified for the first time through PCR technology with primers designed according to ATP8 genes and ATP6 genes of some other mammals reported , which are cloned , sequenced and analyzed preliminarily. The result shows that the full length of the PCR product is 942bp which contains ORF 842 encoding the ATP8 and ATP6 genes with a 43bp overlap between them. The ATP8 sequence is 204bp encoding a protein with 67 amino acid residues whose molecular weight is 7.9KD and isoelectric point is 10.35. The ATP6 gene is 682bp encoding a protein with 226 amino acid residues whose molecular weight is 24.8KD and isoelectric point is 10.63. Both of them are highly homologous to those of other mammals reported. Construction of phylogenetic tree based on nucleotide sequence manifests that the Asian black bears with Sichuan subspecies have closer relationship to the American black bears.

Key words :Asian black bear subspecies ; *Ursus thibetanus mupinensis* ; mtDNA ; ATP synthase ; subunit ; gene cloning ; Sichuan

(责任编辑 李若溪)