

团头鲂促甲状腺激素 β 亚基基因的克隆及序列分析

曲宪成, 杨艳红, 刘其根, 刘颖

(上海水产大学 生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:利用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增法(RACE)克隆团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)脑下垂体中促甲状腺激素 β 亚基(TSH β)基因,并对其进行基因结构和系统进化进行分析。该基因 cDNA 序列全长 614 bp;5' 端非翻译区 100 bp;3' 端非翻译区 61 bp;开放阅读框架(ORF)453 bp,共编码 150 个氨基酸。其编码的氨基酸序列与鳊鱼(*Aristichthys nobilis*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、金鱼(*Carassius auratus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、鲑鱼(*Salmo salar*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、欧洲鳗鲡(*A. anguilla*)的相似性分别为:99.3%、92%、92%、82%、62.6%、62.6%和 56%。核苷酸序列分析显示,团头鲂与鳊鱼相似性最高,为 98.23%;与欧洲鳗鲡相似性最低,为 48.7%。说明 TSH β 亚基在长期的进化中相当保守。在所比较的 9 种鱼类该基因 ORF 氨基酸序列中都含有定位相同的 12 个半胱氨酸残基,它们在成熟肽中形成 6 个二硫键,这对保证促甲状腺激素的空间结构,维持促甲状腺激素的生理功能起着重要的作用。该基因的成功克隆不仅为 TSH β 的分子进化和相似性比较研究提供了新的资料,而且对进一步研究该基因的功能、表达具有重要的意义。[中国水产科学,2006,13(1):128-133]

关键词:团头鲂;促甲状腺激素 β 亚基;cDNA 末端快速扩增;克隆;序列分析

中图分类号:Q959.468 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)01-0128-06

促甲状腺激素是由腺垂体分泌的一种异源二聚体糖蛋白激素,它由非特异性的 α 亚基和特异性的 β 亚基以非共价键连接而成^[1],在调控甲状腺功能及维持体内甲状腺激素水平稳定等方面具有重要的作用,其活性已在多种硬骨鱼类中被发现。在同一物种中, α 亚基与其他的二聚体糖蛋白激素,如 LH(促黄体激素)/FSH(促卵泡激素)/CG(绒毛膜促性腺激素)等的 α 亚基相同,其功能是用于激活腺苷酸环化酶;而 β 亚基与识别受体有关, β 亚基由位于不同染色体上的基因编码并且授予了不同糖蛋白激素各自特异的生物学特性^[2]。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)是中国特有的淡水养殖品种之一,其肉质细嫩鲜美,深受广大消费者的喜爱。目前,许多研究者正致力于团头鲂的遗传育种^[3]、养殖及对生长起决定作用的生长激素^[6]、生长抑素等方面的研究,但有关团头鲂促甲状腺激素 β 亚基基因(TSH β)的研究,在国内外尚未见报道。鉴于 TSH β 亚基基因的重要作用,本研究首先根据已知鱼类该基因的保守区域设计引物扩增团头鲂部分序列,然后在获得的部分团头鲂 TSH β

序列的基础上设计基因特异性引物,运用 SMART-RACE 技术扩增该基因的全长,并对该基因序列的结构及推导的蛋白质序列进行比较分析。该基因的克隆将为进一步研究 TSH β 亚基基因在团头鲂生长、性成熟等方面可能所起的作用,以及外源性内分泌干扰物质对 TSH β 亚基基因表达影响的研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 团头鲂购于上海松江水产良种场,体长 20-30 cm,体重 150-250 g。在自然条件下,饲养于研究室内 160 L 的塑料箱内。饲养期间没有投喂饲料,饲养 3 周后,从团头鲂头部蝶鞍背面的小骨腔内取出脑下垂体进行 RNA 提取。

1.1.2 试剂 抽提 RNA 用的 Trizol reagent 购自 Invitrogen™ life technology 公司;DNA Ladder, Loading Buffer 以及 DH5 α 购自北京鼎国生物技术有限责任公司;一般反转录及 PCR 使用的 dNTP Mixture, TaKaRa Taq™, Ribonuclease inhibitor,

收稿日期:2005-07-11; 修订日期:2005-09-12.

基金项目:教育部回国人员科研启动基金(科 01-113);上海市重点学科建设项目资助(Y1101);上海水产大学博士启动基金(科 00-119).

作者简介:曲宪成(1965-),男,博士后,副教授,主要从事水生动物生理方面的研究。Tel:021-65710525; E-mail:cxq@shu.edu.cn

通讯作者:刘其根。E-mail:qgliu@shu.edu.cn

Oligo d(T)18 Primer, pMD18-T 等购自宝生物工程(中国)有限公司; M-MLV Reverse Transcriptase 购自 Progma 公司; Nucleo Trap gel 回收试剂盒购自 BD Biosciences, RACE 法克隆用的试剂盒购自 BD Biosciences 公司生产的 BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 脑下垂体中总 RNA 的提取 实验室活体解剖团头鲂取脑垂体于 1.5 mL 离心管中,加入 Trizol reagent 试剂 1 mL,匀浆器匀浆后,氯仿抽提,异丙醇沉淀,适量 0.01% DEPC 水溶解总 RNA。然后通过变性琼脂糖凝胶电泳溴化乙锭(EB)染色显示 28 s 和 18 s,检测 RNA 的完整性。

1.2.2 引物设计与合成 首先根据 GenBank 中已报道鱼类 TSH β 亚基 cDNA 开放阅读框(ORF)保守区域,运用 Primer Premier 5 结合 Dnastar 分析软件及 BLAST 程序,设计并合成了以下一组扩增部分序列的引物,引物序列如下:

P1 上游:5'-GGTTGGCATGCTGGGTATTTTG-3'

P2 下游:5'-GGGCACA(T/C)TCATCACTGT-3'

以引物 P1、P2 进行团头鲂 TSH β 亚基基因部分序列扩增,然后再以扩增出的部分序列为基础,分别设计了扩增团头鲂 TSH β 亚基 3' 端及 5' 端的基因特异性引物 P3、P4,引物序列如下:

P3:5'-GCAGCACCTATGTGTGCCCCCACTG-3'

P4:5'-GATAGGTGCAGCCCTCTGAACCAGG-3'

所需引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.3 RT 及 RACE 扩增 RT 及 cDNA 末端快速扩增按照 BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒的说明书进行。简述如下,取 1 μ g 总 RNA 为模板,采用引物 3' CDS-primer 和反转录酶 BD Powerscript Reverse transcriptase 在 10 μ L 的反应体系中合成 3' RACE cDNA。RT 反应产物用 100 μ L Tricine-EDTA buffer 稀释后,取稀释液 2.5 μ L 为模板,采用聚合酶 50 $\times$ BD Advantage 2 Polymerase Mix,通用引物 UPM 和 P3 进行 3' 扩增。反应条件为:94 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 3 min, 5 个循环;94 $^{\circ}$ C, 30 s, 70 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 3 min, 5 个循环;94 $^{\circ}$ C, 30 s, 68 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 3 min, 25 个循环;最后,4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。5' RACE 操作流程基本同 3' RACE,不同之处在于 5' RACE-RT 以 5' CDS-Primer 及 BD-SMART II A oli-

go 为反转录引物。采用 5' RACE cDNA 为模板,通用引物 UPM 和 P4 进行 5' 端扩增。

1.2.4 RACE 产物的纯化、克隆及测定分析 将 RACE 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用 Nucleo Trap gel(BD Biosciences)回收试剂盒对目的基因片段进行回收纯化。并将纯化后的 RACE 产物与 pMD18-T 载体连接构建重组质粒,转化感受态大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α ,经平板培养后,筛选重组子进行插入片段检测,并进行测序分析。序列测定由上海基康生物科技有限公司完成。所得序列用 Dnastar 分析软件进行分析,用 Edit Seq 推测 ORF 及蛋白质序列,用 MegAlign 对核苷酸、蛋白质序列进行分析。

2 结果

2.1 琼脂糖凝胶电泳分析

2.1.1 团头鲂 TSH β 亚基部分片段扩增的结果 用引物 P1、P2 进行 PCR 扩增,得到的产物只有一条明带,其长度为 298 bp,与预期长度大小相同。将 PCR 产物进行序列分析结果;其与鲮鱼、鲤鱼、金鱼和斑马鱼的相似性分别为:98.2%、94%、90%和 90%。同源性很高,故可推测是团头鲂 TSH β 亚基 cDNA 的部分序列(图 1)。

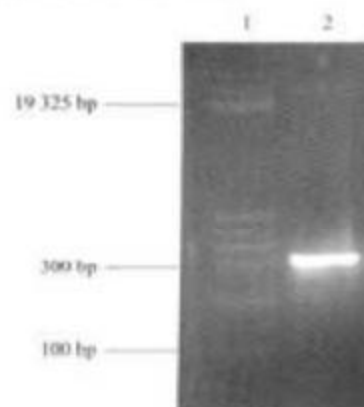


图 1 部分序列扩增结果

1: 100 bp 分子量标记; 2: 部分序列扩增产物

Fig.1 PCR product of partial TSH β subunit

1: 100 bp molecular marker. 2: Partial product

2.1.2 3' RACE 及 5' RACE 结果 以试剂盒内的通用引物 UPM 和基因特异性引物 P3 进行 3' 端扩增,产物只有一条明带,长度为 441 bp(图 2);同样以通用引物 UPM 和基因特异性引物 P4 进行 5' 端扩增产物也只有一条明带,长度为 292 bp(图 3)。

2.3 同源性比较

运用 Dnastar 分析软件,将所得序列与其他鱼类 TSH β 亚基因序列进行同源性分析显示:其氨基酸序列与鳊鱼、鲤鱼、金鱼、斑马鱼、鲑鱼、虹鳟、欧洲鳊等的序列相似性分别为:99.3%、92%、92%、

82%、62.6%、62.6%、56%;核苷酸序列与鳊鱼同源性最高,为 98%,与欧洲鳊同源性最低,序列相似性为 48.7%,其结果基本反应了它们的系统分类地位。另一方面,在所比较的几种鱼 TSH β 亚基氨基酸序列中都含有定位相同的 12 个半胱氨酸残基(图 5)。

1 MSP-LCVVGMGLGLLMKIAAPMCAPT EYTIY	团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>
1 MSP-LYVVGMGLGLLMKIAAPMCAPT EYTIY	鳊鱼 <i>Aristichthys nobilis</i>
1 MSP-VYVVGMGLGILMKVAMP MCAPT EYTIY	鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>
1 MSP-VYVVGMGLGILMKVAMP MCAPT EYTIY	金鱼 <i>Carassius auratus</i>
1 MSL-LYVIGMGLGLLMKVAVPMCAPTDYTIY	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>
1 MELSVAMCGLLCLLFSQAVPMCVPTDYTLY	鲑鱼 <i>Salmo salar</i>
1 MELSVAMYGLLCLLFSQAVPMCVPTDYTLY	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>
1 MRVVLLASAVLCLLAGQVLSICSPVDYTLY	鳊鱼 <i>A. anguilla</i>
★	
30 IERQECNYCVAVNTTICMGFCFSRDSNVKE	团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>
30 IERQECNYCVAVNTTICMGFCFSRDSNVKE	鳊鱼 <i>Aristichthys nobilis</i>
30 IERQECNYCVAVNTTICMGFCFSRDSNVKE	鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>
30 IERQECNYCVAVNTTICMGFCFSRDSNVKE	金鱼 <i>Carassius auratus</i>
30 IERQECNYCVAVNTTICMGFCFSRDSNIKE	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>
31 EERRECDFCVAINTTICMGFCYSRDSNMKE	鲑鱼 <i>Salmo salar</i>
31 EERRECDFCVAINTTICMGFCYSRDSNMKE	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>
31 VEKPECDFCVAINTTICMGFCYSLDPNVVG	鳊鱼 <i>A. anguilla</i>
★ ★ ★ ★	
60 LVGPRFLVQRGCTYQVEYRTAILPGCPSY	团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>
60 LVGPRFLVQRGCTYQVEYRTAILPGCPSY	鳊鱼 <i>Aristichthys nobilis</i>
60 LVGPRFLVQRGCTYQVEYRTAILPGCPSH	鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>
60 LVGARFLVQRGCTYHEVEYRMAILPGCPSH	金鱼 <i>Carassius auratus</i>
60 LVGPRFLVQRGCTYQVEYRTAVLPGCPSH	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>
61 LAGPRFLVQRGCTYQVEYRTVILPGCPLH	鲑鱼 <i>Salmo salar</i>
61 LAGPRFLVQRGCTYQVEYRTVILPGCPLH	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>
61 PAVKRLVQRGCTYQAVEYRTAELPGCPFH	鳊鱼 <i>A. anguilla</i>
★ ★ ★ ★	
90 ADPHFTYPVALSCHCSTCNTHSDECAHKTS	团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>
90 ADPHFTYPVALSCHCSTCNTHSDECAHKTS	鳊鱼 <i>Aristichthys nobilis</i>
90 ADPHFTYPVALSCHCSTCNTHSDECAHRTS	鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>
90 ADPHFTYPVALSCHCSTCNTNSDECAHKTN	金鱼 <i>Carassius auratus</i>
90 ADPHFTYPVALSCHCSTCKTHSDECALRTR	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>
91 ANPLFTYPVALSCHCGTCNTDSDECAHKAS	鲑鱼 <i>Salmo salar</i>
91 ANPLFTYPVALSCHCGTCNTDSDECAHKAS	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>
91 VDPRFSYPVALHCTCRACDPARDECTHRAS	鳊鱼 <i>A. anguilla</i>
★ ★ ★ ★	
120 N-AARKCSKP-VRHLYPDHEENSYIQPYWE	团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>
120 N-AARKCSKP-VRHLYPDHEENSYIQPYWE	鳊鱼 <i>Aristichthys nobilis</i>
120 N-AGMKCSKP-VRHLYPDPEENSYIQAYWE	鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>
120 N-AGMKCSKP-VRHLYPDPEENSYNQAYWE	金鱼 <i>Carassius auratus</i>
120 S-AGMRCSKP-VHHLYP--EENNYAQAYWD	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>
121 SGDGA RCSKP-LRHIYHTLA	鲑鱼 <i>Salmo salar</i>
121 SGDGA RCSKP-LRHIYPYPGLNSYIHPN	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>
121 A-DGDRCSKPLLLHMHAYPGQSNYIQTLL	鳊鱼 <i>A. anguilla</i>
★	

图 5 团头鲂 TSH β 氨基酸序列与其他动物 TSH β 氨基酸序列比较

注:“-”表示此位置缺失氨基酸,“★”表示半胱氨酸

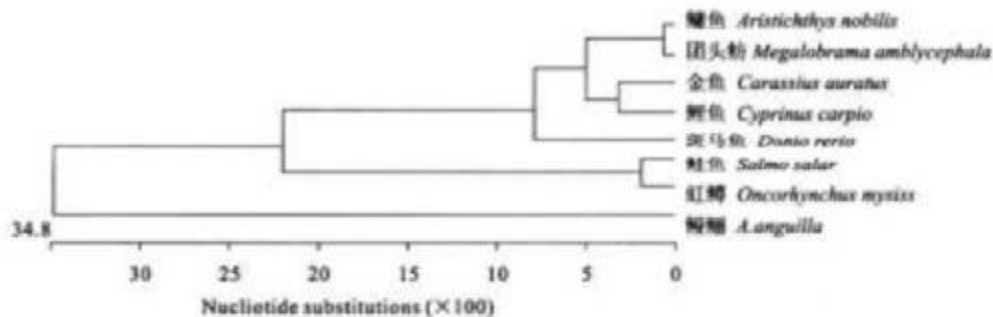
Fig.5 Alignment of *Megalobrama amblycephala* TSH β amino acid sequence with other vertebrate fishes

Note: Dash (-) means absence of amino acid. Asterisk (★) indicates cysteine.

2.4 TSH β 亚基进化分析

运用 Dnastar 分析软件中的 MegAlign 程序,采用 Clustal W 方法进行比对,并使用最大相似性做了系统树。图中直观地表示了团头鲂 TSH β 亚基与各种鱼类的相似程度,结果表明同属鲤科的鳊属团头

鲂与鳊属鳊鱼 TSH β 亚基同源性最高为平衡的内部分支,与鲤属鲤鱼和鲫属金鱼同源性相对较远,与鳊属科鳊属鳊鱼 TSH β 亚基同源性最低,从分子水平阐明了鱼类的同源关系(图 6)。

图6 TSH β 亚基蛋白质的系统树

注:使用 DnaStar 选择最大相似方法所构建

Fig.6 Phylogenetic tree of TSH β proteins

Note: The tree was constructed by DnaStar using maximum likelihood

3 讨论

SMART RACE 技术是一种基于 PCR 原理由已知的部分 cDNA 序列来获得完整 cDNA 5' 端和 3' 端的方法。该方法利用 MMLV RT 的突变体能够在逆转录结束时,行使末端转移酶的功能在 cDNA 第一链 3' 末端加 3 至 5 个 C 碱基的特点,使用基因特异性引物与试剂盒内特定引物共同扩增完整的 5' 端和 3' 端部分片段,是一种方便、有效的由已知序列扩增未知序列的方法。RACE 法最大的优点是:用 cDNA 文库来分离很难得到的、丰度很低的基因,用 RACE 法就比较容易。RACE 法分离全长 cDNA 的关键是设计合适的引物,并且引物设计的合适与否决定了该实验能否成功。

本实验运用 RACE 法快速扩增获得了 614 bp 的团头鲂 TSH β 亚基基因 cDNA 全长序列,并且运用 DnaStar 中的 EditSeq 序列编辑程序及 MegAlign 比对程序对团头鲂 TSH β 亚基基因进行了分析,并对推导出的氨基酸序列进行了相似性比较。氨基酸序列相似性比较显示,该基因与鳊鱼相似性最高,为 99.3%;鲤鱼、金鱼次之,为 92%;这说明在长期的进化过程中 TSH β 亚基拥有较强的保守性。此外,在不同种属鱼类氨基酸序列的比较中还发现:在所比较的 9 种鱼类 TSH β 亚基氨基酸序列中,都含有

定位相同的 12 个半胱氨酸残基,根据已知鱼类 TSH β 亚基的蛋白质结构得知,这 12 个半胱氨酸残基的位置非常保守,它们在成熟肽中形成 6 个二硫键,其对促甲状腺激素的正常折叠、蛋白质构象的确定、维持空间结构以发挥有效的生理功能有着重要的作用^[6]。随着越来越多生物的 TSH β 亚基基因被克隆,这对进一步研究该基因的结构、功能及表达具有重大的意义,这也将更有利于了解该基因对机体发挥作用的机理。

参考文献:

- [1] Martin S A M, Wallner W, Youngson A F, et al. Differential expression of Atlantic salmon thyrotropin β subunit mRNA and its cDNA sequence[J]. Fish Biology, 1999, 54:756-766.
- [2] Ito M, Koide Y, Takamatsu N, et al. cDNA cloning of the β subunit of teleost thyrotropin[J]. Physiology, 1993, 90: 6 052-6 055.
- [3] 李思发, 蔡完琪. 团头鲂双向选育效应研究[J]. 水产学报, 2000, 24(3):201-205.
- [4] 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 411-412.
- [5] Harlyn D P, Halvorson O. A putative signal peptide recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides[J]. Mol Biol, 1983, 167:391-409.
- [6] Luo H H, Bai J J, Ye X. Molecular cloning and sequence analysis of growth hormone cDNAs from two species of garundi[J]. Agri Biol, 2001, 9(4):346-349.

Cloning and sequence analysis of thyrotropin β subunit gene of *Megalobrama amblycephala*

QU Xian-cheng, YANG Yan-hong, LIU Qi-gen, LIU Ying

(College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Thyroid-stimulating hormone (TSH) is an important glycoprotein hormone in regulating the synthesis and secretion of thyroid hormones as well as maintaining its stabilization. It is synthesized and secreted by thyrotropin cells of the anterior pituitary gland. TSH is comprised of two subunits, α subunit and special β subunit. The latter determines the unique biological function of this hormone. Because of the importance of TSH β subunit, it is of great importance to further study the gene of TSH β subunit. In this study, RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) were used for the cloning of TSH β full-length cDNA from the pituitary of *Megalobrama amblycephala*. The structure and phylogenesis of this gene were also analyzed. Sequence analysis reveals a 614 bp cDNA full-length sequence containing 100 bp 5'-untranslated region, 61 bp 3'-untranslated region and 453 bp open reading frame (ORF), which encodes 150 amino acids. The deduced amino acid sequence was aligned with *Aristichthys nobilis*, *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus* (goldfish), *Danio rerio*, *Salmo salar*, *Rainbow trout* and *A. anguilla*, and the sequence similarities are 99.3%, 92%, 92%, 82%, 62.6% and 56%, respectively. TSH β gene ORF cDNA sequence was also compared with those from other fishes, and it has the highest similarity with *Aristichthys nobilis*, which is 98.23%; and the lowest similarity with *A. anguilla*, which is 48.7%. These results indicate that the thyrotropin β subunit gene is highly conserved in the progress of evolution. Meanwhile, twelve cysteine residues forming 6 disulfide bonds and responsible for changing the backbone directions of the protein structure are also conserved in the TSH β subunit of *Megalobrama amblycephala*, which play an important role in displaying effective physiology function of TSH. The successful cloning of this gene not only provides new material for researches on TSH molecular evolution and similarity comparison, but is also very important for further study of the gene function and expression. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1): 128–133]

Key words: *Megalobrama amblycephala*; thyroid-stimulating hormone β subunit (TSH β subunit); rapid amplification of cDNA ends (RACE); cloning; sequencing analysis

Corresponding author: LIU Qi-gen. E-mail: qgla@shfu.edu.cn