

鲮生长激素基因 cDNA 的分子克隆和序列分析

江世贵¹, 张殿昌^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;

2. 中山大学生命科学院, 广东 广州 510275)

摘要:根据生长激素 (growth hormone, GH) 基因的保守性序列设计 1 对引物, 利用 RT-PCR 技术从鲮 (*Cirrhina molitorella*) 脑垂体组织中克隆出鲮生长激素成熟肽 cDNA 片段, 将纯化的 DNA 片段克隆到 pUCm-T 载体上。克隆的鲮 GH cDNA 开放阅读框全长 567 bp, 编码由 188 氨基酸残基组成的生长激素成熟肽。序列分析结果表明, 鲮 GH 成熟肽氨基酸序列与另 2 种鲮—印鲮 (*Cirrhina mrigala*) 和南亚野鲮 (*Labeo rohita*) 的成熟肽氨基酸序列同源性分别为 87% 和 83%, 与鲤的成熟肽氨基酸序列同源性为 96%, 并对 9 个科的 17 种鱼进行了分子系统进化树分析, 结果与根据传统的形态学和生化特征分类进化地位基本一致。本研究所克隆的基因序列和推测的蛋白质序列已登录入 GenBank、EMBL 和 DDBJ 基因库, 序列号分别为 AF458105 和 AAL51107.1。

关键词:鲮; 生长激素; 分子克隆; 序列分析

中图分类号: Q595.468; Q575.11

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2003)02-097-05

生长激素 (growth hormone, GH) 是脊椎动物脑垂体细胞合成和分泌的一种单链多肽激素, 具有广泛生理功能的生长调节因子, 能促进蛋白质合成, 加速脂肪代谢, 提高饲料转化效率, 调节海河洄游性鲑科鱼类渗透压, 增强鱼体对高盐环境的适应能力等重要作用, 被认为是最有效的生长促进剂之一, 有重要的潜在应用价值。生长激素、催乳激素 (prolactin, PRL) 和生长乳素 (somatolactin, SL) 具有相似的结构和交叉的功能, 推测它们起源于共同的祖先基因, 同属于 GH/PRL/SL 基因家族^[1]。

目前, 已有 20 多种鱼类的 GH 基因被分离和克隆^[2], 有近 10 种鱼类的 GH cDNA 在大肠杆菌和酵母中得到表达, 其活性与天然生长激素相一致^[3]。已有的研究表明, 生长激素在鱼类的生长发育和生殖调控中起重要作用。但至今无论从蛋白质水平还是从基因水平, 对鱼类生长激素的研究都不够深入, 尚有许多基本理论问题未充分阐明。为进一步研究鱼类生长激素的生理功能和作用机制, 本研究以我

国重要养殖鱼类鲮为材料, 根据生长激素基因的保守序列设计 1 对引物, 利用 RT-PCR 技术首次扩增出鲮生长激素基因 cDNA, 并对其序列进行分析比较, 旨在从分子水平研究鱼类进化机制提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织样品 雌性成熟鲮 (*Cirrhina molitorella*) 由广州市白云区水产研究所陈国权提供, 取脑垂体组织用于实验。

1.1.2 宿主菌和质粒 pUCm-T 载体购自威佳生物工程公司, 大肠杆菌 DH5a 由本室保存。

1.1.3 试剂和酶 限制性内切酶、T₄DNA 连接酶、碱性磷酸酶购自宝生物工程公司。RNA 提取试剂盒 Trizol Reagent 和逆转录试剂盒 T_{HERMO}S_{CRIP}TM RT-PCR System 购自 Invitrogen 公司。其他产品的纯度为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 脑垂体组织的处理 将活的鲮断头处死, 迅速取出脑垂体, 在液氮中充分研磨, 待液氮挥发完全后, 加入适量的 Trizol Reagent, 置于 -80 °C 超低温

收稿日期: 2002-01-25.

基金项目: 广东省“十五”公关项目资助(99B06103G).

作者简介: 江世贵(1964-), 男, 研究员, 主要从事海洋生物技术研究. E-mail: jiangsg@21.com

冰箱中保存以备提取 RNA 使用。

1.2.2 脑垂体总 RNA 提取 将含鲮脑垂体组织的 Trizol 变性液离心后取上清液,参考 invitrogen 公司 Trizol Reagent 介绍的方法稍做修改进行总 RNA 的提取,电泳分析所提取 RNA 的质量。

1.2.3 引物设计与 RT-PCR 鱼类 GH 基因具有较高的保守性。根据与鲮亲缘关系较近的鲤 GH cDNA 序列设计 1 对引物,上游引物 P₁-GH:5'-ATGG AAAACCAGCGCCTCTTC-3';下游引物为 PGH:5'-CTAATGCGATAGTTGCTTC-3'。按逆转录试剂盒 THERMO SCIENTIFIC RT-PCR System 介绍的方法进行 cDNA 第 1 链的合成和 PCR 扩增,将总 RNA 和 oligo(dT)₂₀ 于 65 ℃ 温育 5 min 使其变性后立即放于冰上,加入适量的 cDNA 合成引物于 60 ℃ 60 min 合成 cDNA 第 1 链,然后用 invitrogen 公司的高保真聚合酶(PLATINUM Taq DNA Polymerase High Fidelity)进行 PCR 扩增,30 个循环。PCR 反应条件为变性 94 ℃、120 s,退火 55 ℃、60 s,延伸 68 ℃、45 s。循环结束后 72 ℃ 延伸 10 min。反应结束后取出 PCR 管立即放于冰上,加入 0.2 μL 普通 Taq DNA 聚合酶,重新将 PCR 管放入 PCR 仪中 72 ℃ 反应 10 min。取 5 μL PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,预计会产生 1 条约 570 bp 的扩增带。

1.2.4 GH cDNA 克隆 PCR 产物经纯化后,按 1:1 的比例与 pUCm-T 载体混合,在 T₄ DNA 连接酶作用下,将纯化的 DNA 片段插入到 pUCm-T 载体中,构建 pUCm-GH 重组质粒。转化感受态大肠杆菌 DH5a,用蓝白斑和酶切电泳法筛选重组子^[4]。

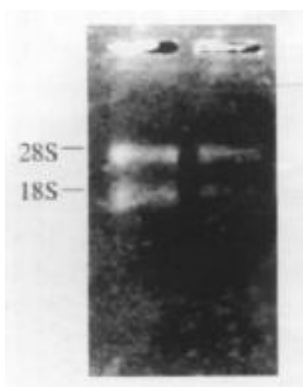


图 1 鲮脑垂体总 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of total RNA of pituitary in *C. molitorella*

1.2.5 DNA 序列测定 在上海博亚生物工程有限公司用通用引物进行测序,用 DNA 分析软件分析测序结果。

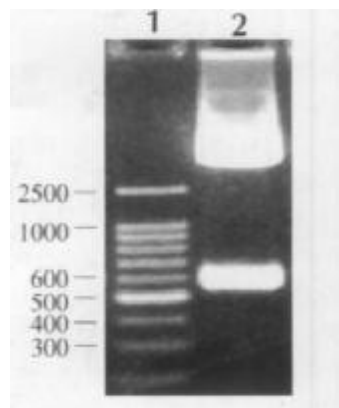
2 结果

2.1 总 RNA 的分离与 RT-PCR 扩增鲮鱼脑垂体 GH cDNA

从 50 mg 脑垂体组织中提取总 RNA,经 1% 甲醛变性凝胶电泳检测可见清晰的 28 s、18 s 和 5.8 s 3 条 rRNA 条带,且 28 s 条带的亮度大约是 18 s 条带的 2 倍,表明总 RNA 完整性良好(图 1)。以总 RNA 作模板,以 Oligo(dT)₂₀ 为引物进行逆转录合成单链 cDNA,省去了分离纯化 mRNA 的过程。PCR 产物电泳结果显示,在约 570 bp 处有 1 扩增带。

2.2 脑垂体 GH cDNA 克隆

用高保真 DNA Taq 酶进行 PCR 扩增,大大降低了突变产生的可能性;高保真 DNA Taq 酶不会在 PCR 产物末端加 A,为了用 T 载体进行便捷的克隆,在 PCR 反应完成后,加入普通 DNA Taq 酶在 72 ℃ 再反应 10 min,可在 PCR 产物末端加 A,PCR 产物经纯化后可直接用于与 T 载体的连接。连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5a,筛选得到 5 个重组子(pUCmGH-2、pUCmGH-3、pUCmGH-4、pUCmGH-8、pUCmGH-10),用 Pst I 酶切鉴定,均含有约 570 bp 的插入片段(图 2)。



1. 100 bp Ladder Marker; 2. pUCm-GH/BamH I + EcoR I

图 2 pUCm-GH 酶切电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of restriction pattern of pUCm-GH

2.3 序列测定

取质粒 pUCmGH-2、pUCmGH-3 和 pUCmGH

-4 各自进行双相测序,这 3 个质粒插入片段测序结果一致,说明在扩增过程中没有发生突变。利用软件 BLAST 与 GenBank-EMBL 中已知的 GH 序列进行同源性比较分析,结果证实其为鲮 GH cDNA。测序结果和推测的氨基酸序列见图 3。鲮 GHcDNA 开放阅读框(ORF)全长为 567 bp,编码由 188 个氨基酸残基组成的多肽。从 GH 成熟肽氨基酸的第 1

个密码子 ATG 到终止密码子 TAG,鲮也存在与鲤和鲑 GH 氨基酸序列相同的潜在的 N-糖基化位点(Asn-Xaa-Ser 和 Asn-Xaa-Thr)^[5]。本实验所克隆的基因序列和推测的蛋白质序列已登录入 GenBank、EMBL 和 DDBJ 基因库,序列号分别为 AF458105 和 AAL51107.1。

```

ATG GAA AAC CAG CCC CTC TTC AAT AAC GCG GTC APT CGT GTA CAA CAC CTG CAC CAG CTG 60
M E N Q R L F N N A V T R V Q H L H Q L 20
GCT GCA AAA ATG ATT AAT GAC TTT GAG GAC AGC CTG TTG CCT GAG CAG CGC AGA CAG CTG 120
A A K M I N D F E D S I L P E E R R Q L 40
AGT AAA ATC TTC CTT CTG TCT TTC TGC AAT TCT CAC TAC ATC GAG CCG CCC ACT GGA AAA 180
S K I F P L S F C N S D Y L E A P T G K 60
GAT GAA ACA CAG AAG AGC TCT ATG TTG AAG CTC CTT CAC ATC TCT TCC CGC CTC APT CAG 240
D F T Q K S S M L K L L E I S S R L T E 80
TCT TGC GAG TTC CCC AGC CAA ACC CTG AGC GGA ACC GTC TCG AAC ACC CTG ACC ATC GCG 300
S W F F P S Q T L S G T V S N S L T I G 100
AAC CCC AAC CAG ATC ACT GAG AAG CTG GCC GAC TTC AAA ATG GGC ATC ACT CTG CTC ATC 360
N P N Q I T F K L A D L K M G T S V L T 120
AAG GGA TGT CTC GAT GGT CAA CCT AAC ATG GAC CAC AAC GAC TCC CTG CCA CTG CCT TTT 420
K G C L D G Q P N M D D N D S L P L P F 140
GAG GAC TTC PAC TTG ACC ACG GGG GAG AGC AAC CTC AGA GAA AAC TTT CGT CTG CTG GCT 480
E D F Y L T T G E S N L R E N F R L L A 160
TGC TTC AAG AAG GAC ATG CAC AAC CTG GAA ACC TAC CTG ACG GTT GCA AAC TCC CCG AGA 540
C F K K D M H K V E T Y L R V A N C R R 180
TCC TTG GAT TCC AAC TGC ACC CTG TAG 567
S L D S N C T L * 191

```

下划线为糖基化位点 The underline indicates latent glycosylation site

图3 鲮 GHcDNA 序列和推测的氨基酸序列

Fig.3 Nucleotide sequence of *Cirrhinus molitorella* GH cDNA and the deduced amino acid sequence

2.4 几种鱼类生长激素蛋白序列同源性比较和进化分析

推测的鲮成熟肽氨基酸序列与已报道的印鲮(*Cirrhina mrigala*)和南亚野鲮(*Labeo rohita*)的 GH 成熟肽氨基酸序列进行了同源性比较分析。此外,我们还选取了分属 9 个科的 17 种鱼,根据其成熟肽氨基酸序列的同源性进行了分子进化树聚类分析,这 17 种鱼分别是鲤科的鲮、印鲮(*Cirrhinus mrigala*) (AALC74142)、金鱼(AAC19389)、鲤(*Cyprinus carpio*) (CCA31963)、南亚野鲮(*Labeo rohita*) (AAD30540) 和 魮 (*Megalobrama*

terminalis) (AAK16726); 鲑科的银大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*) (AAA49402) 和大西洋鲑(*Salmo salar*) (CAA32489); 鳊鲃科的本日本鳊(*Auquilla japonica*)^[6]; 鲷科的金头鲷(*Sparus aurata*)^[7]; 鲱科的金枪鱼(*Thunnus thynnus*)^[8]; 鲈科的五条鲈(*Seriola quinqueradiata*)^[9]; 丽鱼科的罗非鱼(*Oreochromis mossambica*) (AAC77875)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis nilotica*)^[10] 和莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mozambique*) (AAC77876); 香鱼科的香鱼(*Plecoglossus altivelis*) (AAL36936); 鲟科的尖吻鲟(*Lates calcarifer*) (AAC59692)。分析

结果见图4。

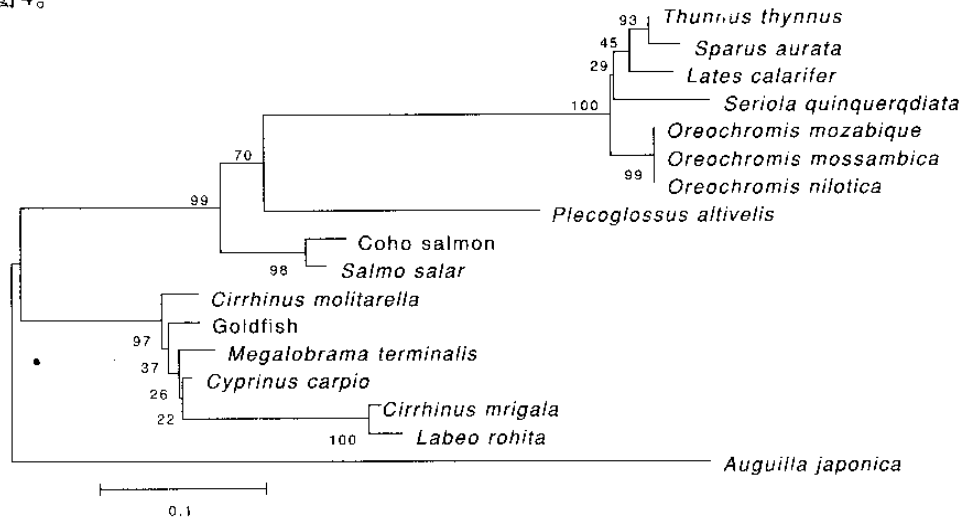


图4 17种鱼类的GH分子进化树聚类分析

Fig.4 Phylogenetic tree inferred from *Cirrhina molitorella* and 16 fish GH amino acid sequence

3 讨论

本研究采用 RT-PCR 技术首次成功地克隆到鲢 GH cDNA 基因,从该基因的核酸序列推测出 GH 蛋白质的一级结构。用软件 DNAsis 和 DNA Tool 对鲢 GH 蛋白的分析结果表明,鲢 GH 成熟蛋白的分子量为 21.4 kD,等电点 pI 为 5.73。利用软件把由鲢 GH cDNA 序列推测出的成熟蛋白序列与 9 个科的 17 种鱼成熟生长激素蛋白氨基酸序列进行比较分析。结果表明,与已报道的其他鲤科鱼类相同,鲢 GH 蛋白有 C⁴⁹、C¹²³、C¹⁶¹、C¹⁷⁸、C¹⁸⁶ 5 个半胱氨酸残基,而其他科的鱼类则没有 C¹²³ 半胱氨酸残基,只有其余 4 个位点的半胱氨酸残基,说明 C¹²³ 可能未参与二硫键的形成,4 个半胱氨酸残基形成的 2 对二硫键对维持蛋白质的特定构象保持其生物活性是必须的^[11];所比较的 17 种鱼 GH 的氨基酸序列都存在 5 个相对保守的氨基酸功能区段 D₁: 5~28; D₂: 48~64; D₃: 71~86; D₄: 109~125; D₅: 158~188,特别是蛋白质 C-端的 D₅ 区段具有高度的保守性,同源性在 80% 以上,这也说明 GH 蛋白 C-末端对维持其生理功能的重要性^[12]。在鱼类和哺乳类 GH 成熟蛋白相应的第 82 位上都存在一个保守的色氨酸残基,可能是 GH 蛋白的重要功能基团。

从分子水平研究鱼类的进化机制是鱼类研究的

重要内容之一,既可验证用传统方法确定的鱼类进化和分类地位,又可能会在分子水平发现一些与传统分类相异的新内容,对深入研究生物进化机制具有重要意义。生长激素基因是一个相对保守的基因,其序列结构具有高度的进化分类意义,可根据其同源性高低,画出脊椎动物 GH 分子系统进化树,并由此决定不同脊椎动物 GH 的系统进化地位。为此,我们选取了分属 9 个科的 17 种鱼类 GH 成熟肽氨基酸序列,利用软件 Clustalx 和 Mega2 分析了它们的 GH 分子系统进化树。结果表明,鲢 GH 成熟肽氨基酸序列与鲤 GH 成熟肽氨基酸序列同源性最高为 96%,说明鲢 GH 与鲤 GH 具有较近的亲缘关系,而与另 2 种同属于同一亚科的印鲢和南亚野鲢的同源性分别为 87% 和 83%,说明鲢 GH 与印鲢和南亚野鲢有较远的亲缘关系,与传统的分类地位不一致,还有待于从形态学和分子生物学等各方面对其进行深入研究;与鲂、金鱼、银大麻哈鱼、大西洋鲑、日本鳟、金头鲷、金枪鱼、五条鲷、罗非鱼、尼罗罗非鱼、莫桑比克罗非鱼、香鱼和尖吻鲈的同源性分别为 93%、94%、66%、67%、53%、56%、56%、42%、55%、56%、55%、56% 和 55%。图 4 所反映的各鱼类的进化关系与根据传统的形态学和生化特征分类进化地位基本一致。

参考文献:

- [1] Satamoto T, Shepherd B S, Madsen S S, et al. Osmoregulatory action of growth hormone and prolactin in an advanced teleost[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1977, 106(1):95-101.
- [2] 陈松林. 鱼类多肽激素基因工程研究进展[J]. *水产学报*, 1993, 17(3):262-272.
- [3] 白俊杰, 马进. 鲤鱼(*Cyprinus carpio*)生长激素基因克隆及原核表达[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(3):409-412.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd ed)[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [5] Lewis U J, Singh R N P, Tutwiller G F, et al. Human growth hormone: a complex of protein[J]. *Rec Prog Horm Res*, 1980, 36:477-509.
- [6] Satio A. Molecular cloning of eel growth hormone cDNA and its expression in *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1988, 73:545.
- [7] Funkenstein B. Cloning and sequence of the Gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone encoding cDNA [J]. *Gene*, 1991, 103:343.
- [8] Sato N. Molecular cloning and nucleotide sequence of tuna growth hormone cDNA[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1988, 849:35.
- [9] Watahiki M. cDNA cloning and primary structure of yellow tail (*Seriola quinqueradiata*) pre-growth hormone[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1988, 70:401.
- [10] Ber R, Daniel V. Structure and sequence of the growth hormone encoding gene from *Tilapia nilotica* [J]. *Gene*, 1992, 113:245.
- [11] Catherine L, Saradee W Panyin. Giant catfish *Pangasianodon gigas* growth hormone-encoding cDNA cloning and sequence by one-sided polymerase chain reaction[J]. *Gene*, 1994, 149:271-276.
- [12] Marshall R D. Glycoproteins[J]. *Annu Rev Biochem*, 1972, 41:673-702.

Molecular cloning and sequence analysis of growth hormone cDNA from *Cirrhina molitorella*

JIANG Shi-gui¹, ZHANG Dian-chang^{1,2}

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The total RNA was isolated from the pituitary of *Cirrhina molitorella*, and the cDNA encoding growth hormone (GH) peptide was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) strategy using total RNA as template. The amplified cDNA fragment was inserted to the vector pUCm-T. The cloned cDNA was composed of 567 bases and encoded 188 amino acid residues. The sequence analysis indicates that the sequence homogeneity in mature GH peptide between *C. irrhina molitorella* and *C. mrigal* is 87%; between *C. irrhina molitroella* and *Labeo rohita* is 83%, and between *C. irrhina molitorella* and *Cyprinus carpio* is 96%. Also, the molecular phylogenesis tree of 17 species of fishes belonging to nine families was established to analyze their homogeneity and evolution, and the results are similar to those analyzed by traditional morphology and biochemistry in their evolution status. The gene sequence cloned in this experiment and the deduced protein sequence have been recorded in GenBank, EMBL and DDBJ, whose numbers are AF458105 and AAL 51107.1, respectively.

Key words: *Cirrhina molitorella*; growth hormone; molecular cloning; sequence analysis