

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01000

鲇 *POMC* cDNA 的克隆与表达分析

丁炜东, 曹哲明, 曹丽萍

中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室,
江苏 无锡 214081

摘要: 采用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增法(RACE)分离、克隆出鲇(*Parasilurus asotus*)垂体阿黑皮素原(proopiomelanocortin, *POMC*)基因全长 cDNA 序列, 共 1 099 bp, 包括 129 bp 5'非翻译区、648 bp 阅读框以及 322 bp 3'非翻译区, 阅读框共编码 215 个氨基酸, *POMC* 前体蛋白的结构主要由信号肽(Met¹-Ala²⁸)、N 端多肽(Gln²⁹-Asp¹⁰²)、促肾上腺皮质激素(ACTH, Ser¹⁰⁵-Met¹⁴⁴)、 α -黑色素细胞刺激激素(α -MSH, Ser¹⁰⁵-Val¹¹⁷)、促肾上腺皮质激素样中叶肽(CLIP, Arg¹²³-Met¹⁴⁴)、 γ -促脂解激素(γ -LPH, Glu¹⁴⁵-Ser¹⁵⁸)、 β -黑色素细胞刺激激素(β -MSH, Asp¹⁶¹-Ser¹⁷⁷)和 β -内啡肽(β -EP, Tyr¹⁷⁸-Leu²¹⁵)构成。分子量计算值为 24.66 kD, 理论等电点为 7.25。同源性分析表明鲇与斑点叉尾鲷的相似性高达 88%, 其构成多肽中 α -MSH、 β -MSH、 β -EP、CLIP 保守性逐渐降低, 而 γ -MSH、连接肽(JP)、 γ -LPH 是变异比较大的区域, 同时鲇 *POMC* 中不含有 γ -MSH, 连接肽和部分 γ -LPH 也不存在。生物信息学分析显示鲇 *POMC* 基因所编码的蛋白质以亲水性区域为主, 具有丰富的 B 细胞抗原位点。定量分析结果表明 *POMC* mRNA 主要在垂体中高表达, 在非垂体组织的脑中表达量最高, 鳃、头肾、肝、脾、肌肉、皮肤等组织也有少量表达。

关键词: 鲇; 垂体; 阿黑皮素原

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)05-1000-11

鲇(*Parasilurus asotus*)属鲇形目、鲇科、鲇属, 是中国常见的经济鱼类, 体形特征为头大且圆、吻纵扁、无腹鳍、臀鳍基长、体表光滑无鳞、侧线完全, 其栖息于水体的底层、游动迟缓, 常以小鱼小虾及水生昆虫为食等特征, 该鱼分布范围广, 适应性强, 肉质细嫩, 肌间刺少, 具有较高的营养价值和经济价值, 是中国南方地区淡水养殖的优良品种。近年来, 其生产中遇到很多问题, 亟待解决, 如自然条件下生长的鲇, 体色呈暗黄色, 肉质较硬, 深受消费者喜爱; 而人工养殖的鲇, 体色一般呈黑色或青色, 肉质较软。

阿黑皮素原(proopiomelanocortin, *POMC*)是促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、 β -促脂解激素(β -lipotropin, β -LPH)、 α, β, γ -黑色素细胞刺激激素(α, β, γ -melanocyte stimulation hormones, α, β, γ -MSH)和 β -内啡肽(β -endorphin, β -EP)等动物脑和垂体中多种活性肽类的共同前体^[1], 这些活性肽类在动物体色、应激、摄食和能量代谢等的调节中起着重要作用^[2-3]。1979 年 Nakanishi 等^[4]首次克隆了牛 *ACTH- β -LPH* cDNA, 从基因水平证实 ACTH 和 β -LPH 由同一基因编码的前体剪切而来, 且发现该基因还编码

收稿日期: 2010-09-28; 修订日期: 2010-12-15.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心)项目(2007JBFC07, 2009JBFC01; 2011JBFA12); 中国水产科学研究院热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室开放课题(2008-Y-004); 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室(LFB20070608)。

作者简介: 丁炜东(1977-), 硕士, 主要从事鱼类遗传育种研究. E-mail: dingwd@126.com

通信作者: 曹丽萍, 主要从事鱼类遗传育种和细胞免疫学研究. E-mail: caolp@ffrc.cn

3 种 MSH, 各种活性肽间通过赖氨酸-精氨酸分隔, 因该前体蛋白加工可形成阿片类物质 β -EP、ACTH 和 α, β, γ -MSH, 因而将其命名为阿片促黑色素皮质激素原 (pro-opinmelanocortin, POMC), 简称阿黑皮素原。研究表明其可能具有促进鱼类性腺成熟、通过调节黑色素细胞中黑色素颗粒的分布调节鱼类体色、促进脂肪分解、抑制脂肪积累、调节渗透压、维持水盐平衡及参与应激反应等多种功能, 对鱼类 *POMC* 基因结构的研究, 不仅为进一步研究其表达调控机理奠定基础, 而且对研究脊椎动物的系统进化也具有十分重要的意义。迄今为止已经克隆了包括软骨鱼纲^[5-6], 硬骨鱼纲肺鱼亚纲^[7-8], 硬骨鱼纲辐鳍亚纲鳉形目^[9]、雀鳝目^[10]、鲤形目^[11]、鲇形目^[12]、鲈形目^[13]和鲑形目^[14]等数十种处于不同分类地位的鱼类的 *POMC* 基因或 cDNA。本研究首先运用 RT-PCR 和 RACE 方法克隆了鲇阿黑皮素原(*POMC*)全长 cDNA, 并通过定量 PCR 方法研究了鲇垂体激素的组织分布, 为深入研究鱼类垂体激素的生理功能、垂体发育的调控奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 取样 鲇购自无锡中桥菜场, 取下丘脑垂体, 用液氮速冻, 保存于液氮内备用。

1.1.2 试剂 AMV 反转录试剂盒、T4 DNA 连接酶、凝胶回收试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、*Eco*RI、*Hind* III, Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0, 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0, 5'-Full RACE Kit, SYBR[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit, pMD18-T, RNAiso Reagent 载体等购自大连宝生物公司, RNase 抑制剂等其他生化试剂购自上海生工生物工程公司, 均为国产分析纯。

1.1.3 仪器 DU-600 紫外分光光度计购自美国 BECKMAN 公司, PCR 仪购自德国 Eppendorf Mastercycler gradient 公司, Mini Opticon 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 BIO-RAD 公司, 实验结果记录和蛋白分析使用的是柯达公司的凝胶成像系统, 全自动测序工作由南通百奥生物工程公司完成。

1.1.4 引物设计 从 GenBank 数据库中搜索已知鱼类等的 *POMC* 基因序列, 根据它们的保守氨基酸和核苷酸序列设计了 2 条简并引物(P1 和 P2) 扩增 *POMC* 部分序列。5'RACE 和 3'RACE 引物根据已获知的保守序列使用 Primer Premier 5.0 软件进行设计, 各引物序列见表 1。

表 1 实验中使用的引物序列及其位置
Tab.1 Nucleotide sequences and positions of primers used in the experiment

引物 primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')	位置/bp postion
P1	TGAGTTCACTTACGCTGTTGC	54-74
P2	CTTCAGTGGTCCTTCTGGTGT	749-769
P3	GGGTGGTGGGAAGAGTCAGC	515-535
P4	ACCATCAGCCAGCAAGAGAA	586-606
P5	CAGCACTGGGCTCTAACCTC	203-221
P6	TGGGAGATTCTGCTGTGAGC	295-313
P7	TGACAGAAATATCCTGGAATGC	252-274
P8	ATGGGCATCTCCAGGGTAGA	314-333
18S rRNA1	GAGAAACGGCTACCACATCC	
18S rRNA2	GATACGCTCATTCCGATTACAG	

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 取室温暂养的鲇解剖取垂体, 参照 RNAiso Reagent 说明书操作, 抽提总 RNA。使用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和 OD 值, 并根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值判断 RNA 的质量, 当该值达到 1.8~2.0 认为符合标准。

取鲇全血(含抗凝剂)10~250 μ L, 按 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 说明书操作, 从血液中抽提基因组 DNA, 测定 DNA 的浓度和 OD 值, 并根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值判断 DNA 的质量, 一般应在 1.8~2.0 之间。抽提样品均贮存于-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中备用。

1.2.2 *POMC* 全长 cDNA 片段的获取

(1)反转录合成第一链 cDNA 取下丘脑垂体提取总 RNA, 以 Oligo(dT)₁₈ 为引物, 根据 AMV 反转录酶使用说明进行 RT 反应。反应体系: 总 RNA 2.0 μ g, 5 $\times$ Buffer 4 μ L, 10 mmol/L dNTPs 2.0 μ L, 40 U/ μ L RNase 抑制剂 0.5 μ L, 2.5 mmol/L dT-AP 引物 1.0 μ L, 200 U/ μ L M-MLV1.0 μ L, 加

DEPC 处理过的 H_2O 至 20 μL 。反应条件: 42℃ 40 min, 90℃ 2 min, 4℃ 保温至关机。−20℃ 保存备用。

(2) 保守片段的分离 以上述 RT 液为模板, 使用引物 P1 和 P2 扩增鲆 *POMC* 部分片段, PCR 反应体系为: 10×反应缓冲液(含 Mg^{2+}) 2.5 μL , 2.0 mmol/L dNTPs 2.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 1 μL , 5 U/ μL *Taq* 酶 0.5 μL , RT 液 1.0 μL , 加灭菌 ddH_2O 至 25 μL 。反应条件为 94℃ 3 min, 然后 30 个循环(94℃ 45 s, 58℃ 45 s, 72℃ 1 min), 最后 72℃ 10 min, 4℃ 保温至关机; PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶, 回收, 连接到 pMD18-T 载体上, 转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 挑取单个白色菌落进行培养, 制备质粒, *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 筛选阳性克隆, 送南通百奥生物技术有限公司测序。

(3) *POMC* cDNA 3'端和 5'端序列的扩增 由上述保守片段的测序结果, 设计特异的 3'RACE 和 5'RACE 引物, 根据 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 和 5'-Full RACE Kit 的使用说明, 分离扩增 3' 和 5'端 cDNA 序列。3'RACE 是通过 2 轮巢式 PCR 反应来完成的, 第 1 轮 PCR 反应以 RT 液为模板, 利用 P3 和 3' RACE Outer Primer 进行扩增; 第 2 轮反应取 2.0 μL 第 1 轮 PCR 产物为模板, 利用 P4 和 3'RACE 内引物进行 3'片段的扩增。同样, 5'RACE 也是通过 2 轮巢式 PCR 反应来完成的, 第 1 轮 PCR 反应以 RT 液为模板, 利用 P6 和 5'RACE 外引物进行扩增; 第 2 轮反应取第 1 轮 PCR 产物 2.0 μL 为模板, 利用 P5 和 5' RACE Inner Primer 进行 5'片段的扩增。反应体系同 1.4.2; 反应条件均为 94℃ 3 min, 然后 30 个循环(94℃ 45 s, 58℃ 45 s, 72℃ 1 min), 最后 72℃ 10 min, 4℃ 保温至关机。第 2 轮扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 回收, 克隆, 鉴定并送测序。

(4) *POMC* cDNA 全长序列的确定 利用上述中间片段、3'RACE 和 5'RACE 片段重叠区域拼接成完整的鲆 *POMC* cDNA 全长序列。为验证序列的正确性, 用得到的 cDNA 序列重新设计特异性上下游引物, 扩增包含翻译区的 cDNA 片段, 然后测序分析得到 *POMC* cDNA 全长序列。用

NCBI/ORF 进行开放阅读框(ORF)的预测, 用 DNAMAN 软件和在线 Blast 工具进行 *POMC* 基因的翻译和同源性比对。

1.3 序列分析

在 NCBI 上用 BLAST 进行同源性检索, 用 DNASTar 5.0、ClustalW 2、Anthept 6.0、Mega 4 等软件进行鲆 *POMC* cDNA 核苷酸及其相应氨基酸的序列分析。

1.4 鲆 *POMC* mRNA 不同组织表达水平的检测

取室温水泥池暂养的鲆 10 尾, 分别采集垂体、脑、鳃、胰、头肾、肝、肌肉、皮肤、胃、后肾样品, 每次随机取 3 尾, 分别装入冻存管, 用液氮速冻后于 −80℃ 保存, 用于提取总 RNA。

为检测鲆 *POMC* mRNA 在各组织中的表达水平, 按照 SYBR[®] PrimeScript[™] RTPCR Kit 使用说明, 进行逆转录反应, 然后采用 SYBRGreen I 嵌合荧光法进行实时定量 PCR 扩增反应, 以鲆 18S rRNA 为内参, 对得到的各样品 C_t 值进行均一化处理, 应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[15]确定各组织中 *POMC* mRNA 的相对含量。RT 反应体系为: 5×Prime Script[™] 缓冲液 2 μL , PrimeScript[™] RT Enzyme Mix I 0.5 μL , Oligo dT 引物(50 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , 随机 6 核苷酸引物(100 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , 总 RNA 500 ng, 加 RNase Free dH_2O 至 10 μL ; 反应条件为: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s。荧光定量 PCR 反应体系为: 2×SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 12.5 μL , PCR 正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , PCR 反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , 模板 cDNA 溶液 2.0 μL , 加 ddH_2O 至 25 μL ; 反应条件为: 95℃ 10 s, 然后 45 个循环(95℃ 5 s, 62℃ 15 s, 72℃ 10 s, 读板记录荧光量), 最后 72℃ 3 min; 溶解曲线的反应条件为 65℃ 到 92℃, 每升高 0.2℃ 保持 0.02 s 读板记录荧光量。

1.5 数据处理

实验数据用 SPSS 11.5 统计软件包中的单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Duncan 氏多重比较进行分析。所有结果均以平均值±标准误($\bar{x}\pm\text{SE}$)表示。

2 结果与分析

2.1 鲇总 RNA 的提取和 POMC cDNA 的克隆

提取的总 RNA 测得的 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.89, 说明提取的 RNA 质量较好, 用琼脂糖凝胶电泳溴化乙啶染色显示 28S、18S rRNA 的清晰条带, 说明提取的 RNA 完整性良好, 可以进行下一步的实验。

取鲇下丘脑垂体总 RNA 以引物 P1、P2 进行 RT-PCR 反应, 结果得到 1 条 700 bp 左右的条带 (图 1 中条带 1)。克隆后测序得到 710 bp 片段。通过 NCBI 上 BLAST 检索, 该 cDNA 序列和基因库中其他动物的 POMC 序列具有较高的相似性 (E 值为 $6e-169$, 远小于 0.005), 对该 cDNA 编码的 215 个氨基酸进行 BLAST 检索, 也与已知的 POMC 蛋白序列有很高的相似性 (E 值为 $1e-101$), 因此确认该片段为鲇 POMC 的部分序列。3'RACE 结果获得 512 bp 左右的条带 (图 1 中条带 2), 经克隆后测序得到 498 bp 片段; 5'RACE 获得 200 bp 左右条带 (图 1 中条带 3), 经克隆后测序得到 221 bp 片段。将上述序列拼接得到 cDNA 全序列, 从而得到鲇 POMC cDNA 全长序列 (图 2)。

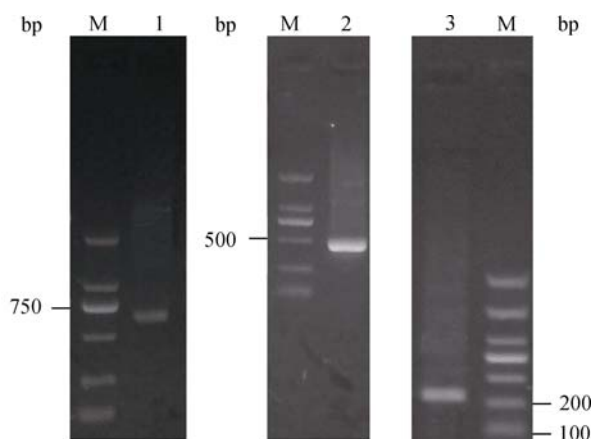


图 1 鲇垂体总 RNA 的 RT-PCR 和 RACE 产物

M: DNA 分子量标记; 1: 引物 p1、p2 扩增片段; 2: 3'RACE 产物; 3: 5'RACE 产物。

Fig.1 RT-PCR and RACE products of total RNA in pituitary of *Parasilurus asotus*

M: DNA marker; 1: the fragment of p1 and p2; 2: the fragment of 3'RACE; 3: the fragment of 5'RACE.

通过对垂体下丘脑与脑不同 POMC cDNA 序列的比较分析, 确定只有 1 种 POMC 基因存在于

鲇体内。POMC cDNA 全长 1 099 bp, 由 648 bp 的开放阅读框、5'非翻译区 129 bp, 3'非翻译区 322 bp 组成, 编码 215 个氨基酸 (图 2), 其分子量计算值为 24.66 kD, 理论等电点为 7.246。氨基酸组成中, 正电荷残基(K, R)总数 32 个, 负电荷残基(E, D)总数 32 个, 极性氨基酸为 52 个, 疏水性氨基酸 59 个。

2.2 POMC 前体蛋白的结构

通过对几种动物 POMC 前体蛋白的重复比对, 确认了鲇 POMC 前体蛋白的结构, 主要由 215 个氨基酸组成, 主要编码信号肽(Met¹-Ala²⁸)、N 端多肽(Gln²⁹-Asp¹⁰²)、促肾上腺皮质激素(ACTH)(Ser¹⁰⁵-Met¹⁴⁴)、 α -黑色素细胞刺激激素(α -MSH)(Ser¹⁰⁵-Val¹¹⁷)、促肾上腺皮质激素样中叶肽(corticotropin-like intermediate lobe peptide, CLIP)(Arg¹²³-Met¹⁴⁴)、 β -促脂解激素(β -lipotropin, β -LPH)(Glu¹⁴⁵-Ser¹⁵⁸)、 β -黑色素细胞刺激激素(β -MSH)(Asp¹⁶¹-Ser¹⁷⁷)和 β -内啡肽(β -endorphin, β -EP)(Tyr¹⁷⁸-Leu²¹⁵)。从图 2、3 中可以看出鲇 POMC 中不含有 γ -MSH, 连接多肽和部分 γ -LPH 也不存在。5 个由 Arg 和 Lys 组成的碱性氨基酸对是保守的, 在鲇 POMC 前体蛋白中也是存在的。另外也有一些活性蛋白中存在着一些保守的氨基酸, 如在 N-端多肽中有 4 个 Cys^{30,36,48,52}、2 个 Leu^{39,56}、2 个 Pro^{61,64}、1 个 Gly⁶⁵ 和 1 个 Gln⁷⁰ 氨基酸残基是高度保守的。在一些种类中位于 N-端的 ACTH (位于 α -MSH) 和 C 端的 γ -LPH (主要位于 β -MSH) 中含有 His-Phe-Arg-Trp 这 4 个高度保守的氨基酸序列。尽管 β -EP 多肽 C 端在不同物种是高度变异的, 但高度保守的氨基酸序列也随处可见, 如 Tyr¹⁸⁰-Gly-Gly-Phe-Met¹⁸⁴ 和 Gln¹⁹²-Lys-Pro-Leu-Leu-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn²⁰¹。此外, 鲇 POMC 前体蛋白中还存在着一些翻译后的修饰模式, 如 3 个蛋白酶 C 磷酸化位点 (SdR⁴¹⁻⁴³, SkR¹⁷⁷⁻¹⁷⁹, SqK¹⁹¹⁻¹⁹³), 2 个酪蛋白酶 II 磷酸化位点 (SqQ^{E155-158}, SwdE¹⁸⁶⁻¹⁸⁹) 和 1 个酰胺化位点 (vGRK¹¹⁶⁻¹¹⁹)。

2.3 同源性分析结果

利用 DNASTar 和 Clustal W 软件对该氨基酸序

列与斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*, AY174051.1)、人(*Homo sapiens*, NG_008997)、鲷(*Acanthopagrus latus*, AF194967)、高首鲟(*Acipenser transmontanus*, AAD17806)、美洲鳗(*Anguilla rostrata*, AAF22344)、鲤 (*Cyprinus carpio*, CAA74967)、鲤 (*Cyprinus carpio*, CAA74968.1)、斑马鱼(*Danio rerio*, AAM93491)、鸡(*Gallus gallus*, NP001026269)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*, NP001118190)、莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*, AAD41261)

```

caggcatcaatacatagtcgacttgacagtggtt
46 gaactatctactcttgagttcacttacgtgttgacaggggac
82 ttccacacaaaccgagagaagcagactttctctgggtgcatta
128 atgactaaagaagtgaagaatgggtatctctgttgatgttagct
    M T K E V R M G Y P V W M L A
    信号肽 Signal peptide
173 ctggctatgctgtgtgcacgtggttctgaggttagagccagtcg
    L A M L C A R G S E V R A Q C
    N-端多肽 N-terminal peptide
218 tgggagaacaccgactgcagagatctaagctctgacagaatc
    W E N T D C R D L S S D R N I
263 ctggaatgcatcaagctgtgcagatctgagctcagcagaatct
    L E C I K L C R S E L T A E S
308 cccatctaccctggagatgcccacgtccagccctctgttcttg
    P I Y P G D A H L Q P L L F L
353 cccaatgaaatcccgctgcccacgtgcccacacagaagacgac
    P N E I P A A T L S T P Q D D
398 gaagctccagagctgtggtccacaaacagaagacagcgtctac
    E A P E S G P Q H E D K R S Y
    α-MSH
443 tccatggagcacttccgctggggcgaagccgtgggtgcgaagcgc
    S M E H F R W G K P V G R K R
488 cgaccattaaagtggtacgcaacgggtgttggaagagtcagcc
    R P I K V Y A N G V V E E S A
    CLIP
533 gaggcattgcccggcgagatgagcggcgagctggtctgctccgag
    E A M P A E M R R E L A A P E
    γ-LPH N-端 N-terminal of γ-LPH
578 gagagcaccatcagccagcaagagaagaagcggccctatagg
    E S T I S Q Q E K K D G P Y R
    β-MSH
623 atgagtcacttctgctggagcagccaccccgagcaaacgctac
    M S H F R W S S P P A S K R Y
    β-Endorphin
668 ggaggettcattgaagtctgggatgagcgcagcaaaagccgctg
    G G F M K S W D E R S Q K P L
713 ctcacgtttttcaagaacatcatcaacaaagacgacaccagaagg
    L T L F K N I I N K D D T R R
758 accactgaagtgttataggggatgaaaagtttatactttcaaccagc
    T T E V L *
807 attcttctcatgagaggttctcatgcatagaatcagtggtcggaatga
861 attcaatagcactttatgttggaagtgaattgaatctatcaacgttgtaaagtg
917 attaatattatatactgataatcatgataatatagggtataatatttcaagc
974 tatagaagtgctaatcagcaaaaaatagaatatataataaattgtattata
1030 agattataaatgatgtaacaagcagaaaaaaccaaaaaagagaaaaa
1082 aaaaaaaaaaaaaaa

```

图 2 鲇 *POMC* cDNA 全长序列及翻译的氨基酸序列
Fig.2 Full length cDNA nucleotide and deduced amino acid sequences of *POMC* gene in *Parasilurus asotus*

等动物的 *POMC* 氨基酸序列进行同源性比较。结果表明, 鲇与斑点叉尾鲷的相似性高达 88%, 其次与人、鲷、高首鲟、美洲鳗、鲤、鲤、斑马鱼、鸡、虹鳟、莫桑比克罗非鱼的相似性分别为 37.5%、78.9%、45.1%、54.6%、55.4%、54.5%、53.6%、40.2%、55.9%、54.6%、55.3%。从同源性比对结果可以看出 α -MSH、 β -MSH、 β -EP、CLIP 保守性依次降低, 而 γ -MSH、连接肽 (Joining peptide, JP)、 γ -LPH 是变异比较大的区域。

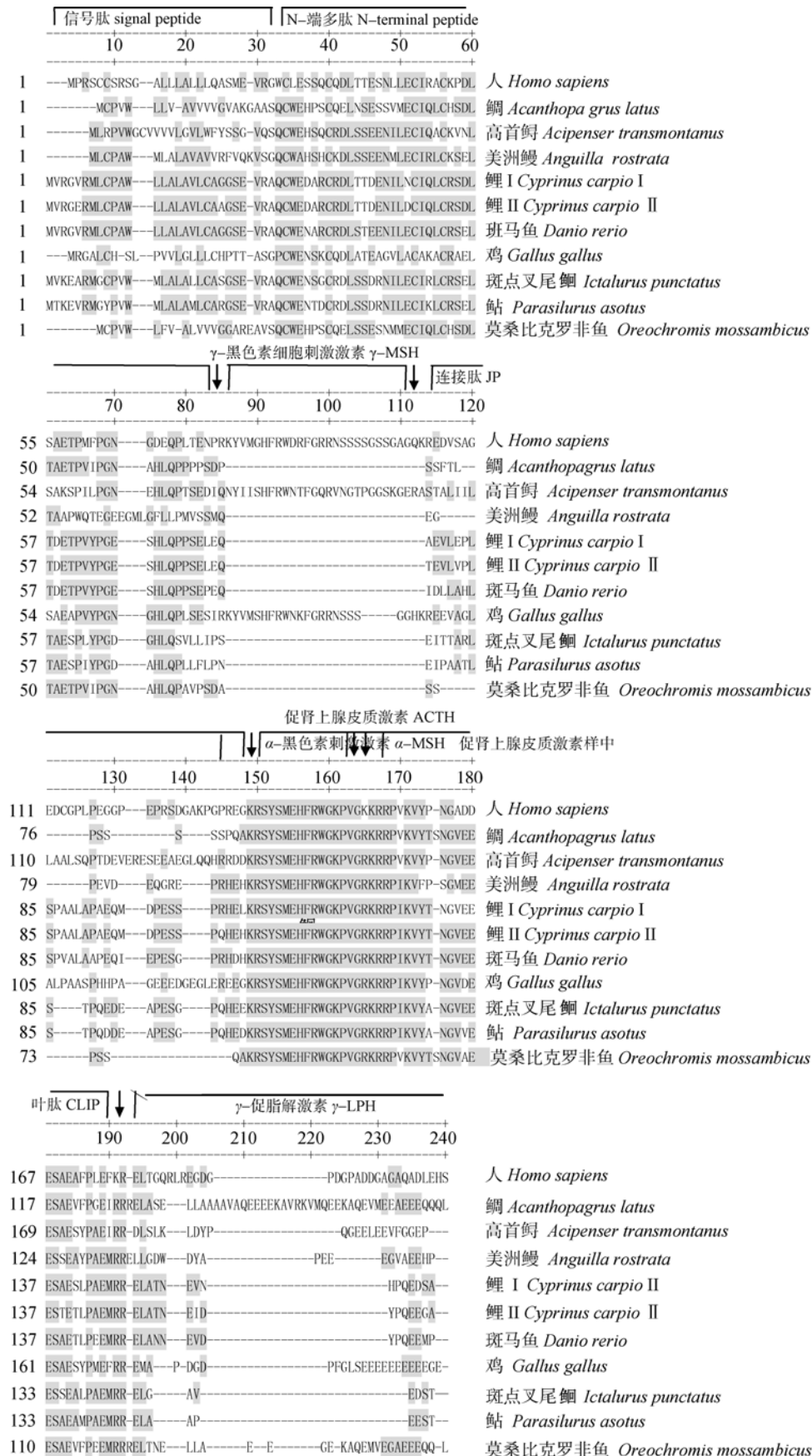
将上述比对结果用 MEGA 4 软件采用 Neighbor-Joining 法, 重复 1 000 次, 构建 Bootstrap 验证的系统发育树。由图 4 可见, 鲇与斑点叉尾鲷基因的亲缘关系最近, 并与金鱼、斑马鱼、鳗鲡同处一个小分支, 但与人、原鸡、高首鲟则处于不同的分支。

2.4 蛋白结构与功能预测

用 DNASar 软件的子程序 Protean 预测鲇 *POMC* 的亲水性、柔韧性、表面可能性及抗原性, 结果如图 5 所示。Kyte-Doolittle 方案预测的亲水性区域大致为 22–46 aa、54–68 aa、84–126 aa、135–196 aa、202–216 aa, 可见亲水性残基所占比例远大于疏水性残基, 因此推测该蛋白是亲水性的。Jameson-Wolf 方案预测抗原性显示, 该蛋白具有丰富的 B 细胞抗原位点, 特别是在 30–46 aa、86–106 aa、111–125 aa、128–196 aa、202–214 aa 这 5 个区域, 为优势抗原表位, 均存在很好的抗原结合位点。从图 5 中还可以明显看出, 抗原表位区域与 Karplus-Schulz 方案预测的柔韧性区域和 Emini 方案预测的表面可能性区域出现了较多的重叠区, 这些区域相对易于形变, 便于抗原、抗体的自由结合, 可能是抗原位点的富集区。

2.5 *POMC* 基因的组织表达

为了研究 *POMC* 基因在鲇不同组织中的表达量, 设计了 1 对位于 *POMC* 外显子 2 和 3 之间的引物。定量检测结果表明(图 6) *POMC* mRNA 主要在下丘脑垂体和脑中表达, 其他组织中表达量都很少, 鳃、头肾、胃、胰要比其他组织中表达量稍多。



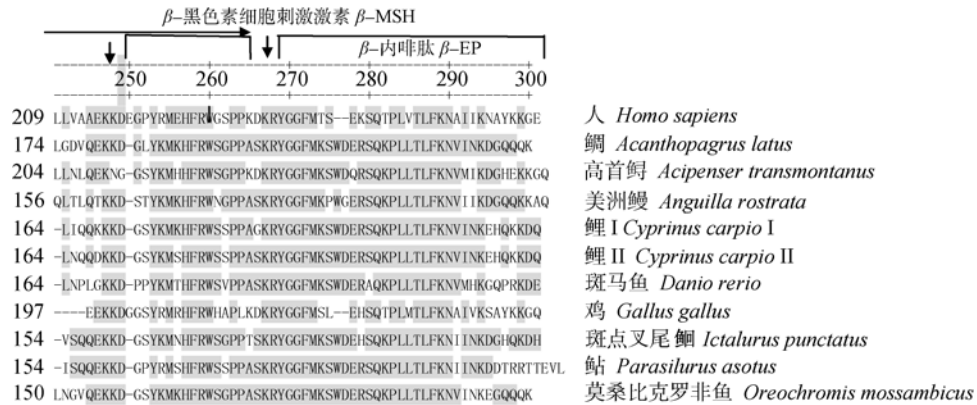


图 3 不同物种 POMC 氨基酸序列的多种比对

相同的氨基酸序列用阴影表示, 可能的裂解蛋白标在上面, 箭头表示可能的裂解位置.

Fig.3 Multiple sequence alignment of POMC amino acid sequences of selected vertebrates

Identical amino acids are shown with shadow. Designation of POMC derived peptides is written above the marked regions. Arrows show the potential cleavage sites.

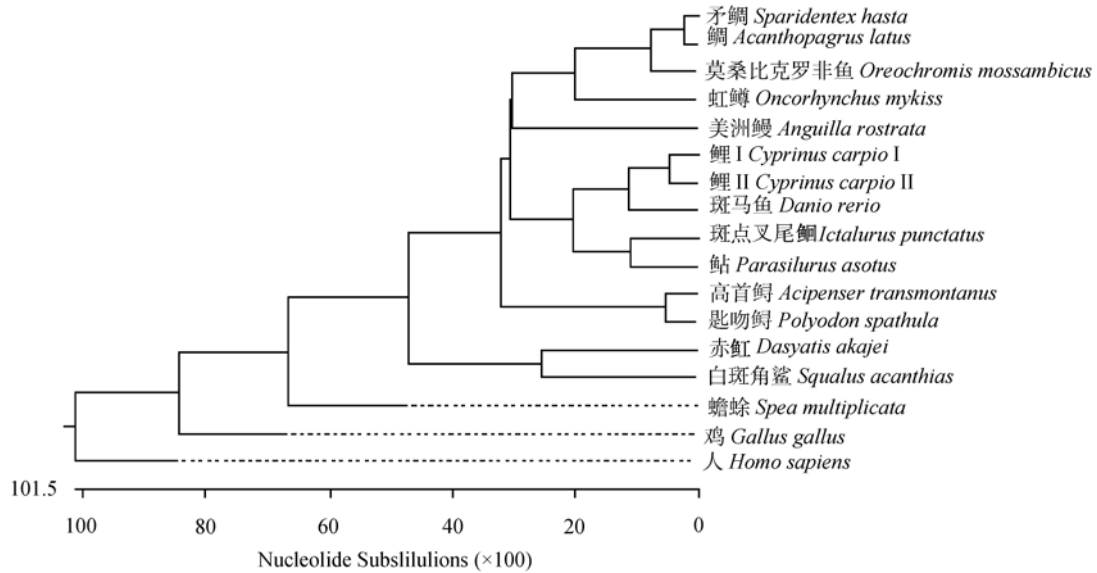


图 4 POMC 系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of POMC.

3 讨论

3.1 鲎 POMC 序列的克隆和结构分析

迄今为止, 在硬骨鱼类罗非鱼^[16]、欧洲鳗 (*Anguilla anguilla*)^[17]等物种中发现存在 1 种 POMC, 而在鲤^[11]、斑马鱼^[18]、大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*)^[19]和虹鳟^[20]中发现存在 2 种 POMC, 条斑星鲽 (*Verasper moseri*)甚至还存在 3 种类型的 POMC(BAB18467、BAB 18468、BAB18469)。本实验根据 GenBank 中与南方鲎亲

缘关系较近的斑点叉尾鲷和金鱼的 *POMC* cDNA 等设计简并引物, 采用 RT-PCR 的方法成功地从鲎垂体和间脑中克隆到 1 种类型的 *POMC* cDNA, 然而采用 RACE 获取 *POMC* 全长时得到了 1 种类型的 *POMC* cDNA, 表明鲎只存在 1 种 *POMC*。 *POMC* cDNA 3'端存在着多个 poly (A)+信号, 这种情况在其他多种鱼类也存在, 如长吻雀鲷 (*Lepisosteus osseus*), 赤魮(*Dasyatis akajei*), 肺鱼 (*Protopterus annectens*, *Neoceratodus forsteri*)等。带有可选择的 poly(A)+信号是 mRNA 较常见的现

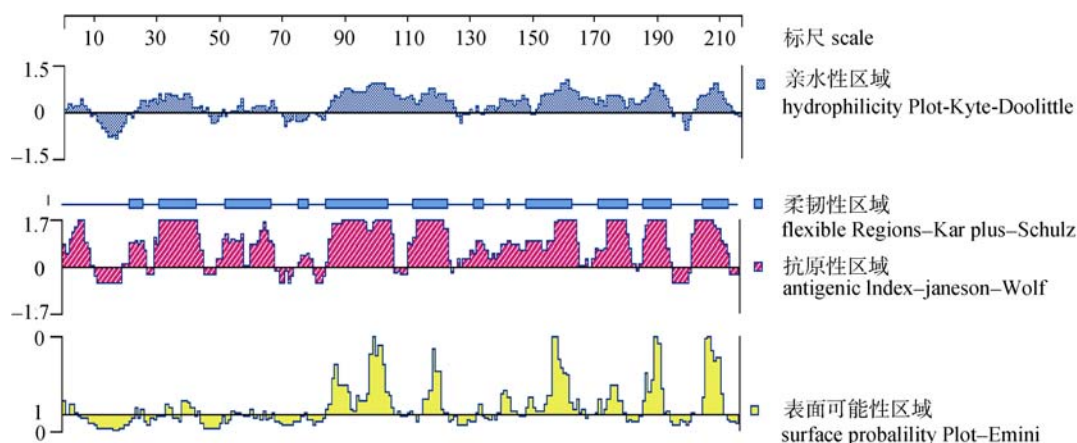


图 5 鲈 POMC 亲水性、柔韧性、表面可能性及抗原性的预测结果

Fig.5 Predict results of hydrophilicity,flexibility,surface probability and antigenicity of POMC in *Parasilurus asotus*

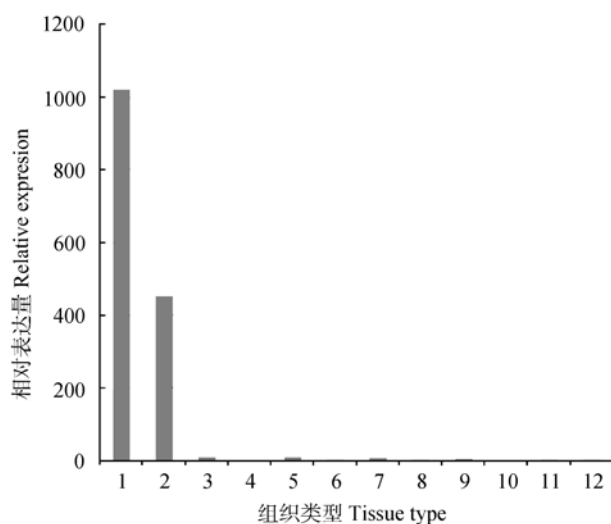


图 6 鲈 POMC mRNA 在不同组织中的相对表达量

1. 垂体; 2. 间脑; 3. 鳃; 4. 心; 5. 头肾; 6. 后肾; 7. 胃; 8. 肝; 9. 胰; 10. 脾; 11. 肌肉; 12. 皮肤。

Fig.6 Relative expression of POMC mRNA detected by real-time PCR analysis in *Parasilurus asotus* tissue.

1. pituitary; 2. diencephalons; 3. gill; 4. heart; 5. head kidney; 6. hind kidney; 7. stomach; 8. liver; 9. pancreas; 10. spleen; 11. muscle; 12. skin.

象, 大约 1/5 的 mRNA 含有组织或时间特异性的 poly(A)+信号, 但这同时也会影响 mRNA 转录本的稳定性和定位的能力^[21-22]。鲈 POMC 基因编码了 215 个氨基酸, 氨基酸数量主要取决于 MSH 区的缺失或增加、N 端氨基酸的插入、C 端氨基酸的增加等。硬骨鱼类普遍不含有 γ -MSH 和 δ -MSH, 而原始肉鳍鱼类和软骨硬鳞鱼类则存在类似于四足类动物中的 γ -MSH。软骨硬鳞鱼类还存在着 1

个与 γ -MSH 在一起的 δ -MSH, 从而使得它们的 POMC 前体蛋白将更长。由鲈 POMC cDNA 推导的氨基酸序列的分析发现, 鲈 POMC 与其他真骨鱼类一样, 包含由一系列碱性氨基酸对(K¹⁰²-R¹⁰³, K¹¹⁹-R¹²⁰, K¹⁴³-R¹⁴⁴, K¹⁵⁹-R¹⁶⁰, K¹⁷⁸-R¹⁷⁹)分隔的功能区, 其蛋白剪切后可产生 ACTH、 α -MSH、CLIP、 β -LPH、 γ -LPH、 β -MSH 和 β -EP 7 种多肽, 不包含软骨鱼纲^[5-6]硬骨鱼纲肺鱼亚纲^[8]、硬骨鱼纲辐鳍亚纲鲱形目^[9]、雀鲷目^[10]以及其他脊椎动物类群^[23-24]所具有的 γ -MSH 功能区。研究显示, 位于第 2 位的 Arg 比位于第 1 位的 Lys 保守。位于 N-端蛋白中的 4 个保守的半胱氨酸形成 2 个二硫键桥, 构成了发夹结构, 这有助于 POMC 前体蛋白三级结构的稳定和调节 POMC 的分泌途径^[25]。位于 α -MSH(H-F-R-W)和 β -MSH(H-F-R-W)的连续 4 个高度保守的氨基酸序列构成了 MSH 的核心组成。位于 N 端的 β -EP 中的蛋脑啡肽的核心序列(Y-G-G-F-M)也具有较高保守性, 只是在密西西比匙吻鲟中第 5 位的 M 被异亮氨酸所取代。每个具有活性的功能区在硬骨鱼类和其他鱼类中都会发生变异, 而鲈与其他硬骨鱼类相比也都存在一些细微的变异。如海鳗(*Petromyzon marinus*)的 POC N-端多肽区插入了一些新的氨基酸。一些鱼类如鲑 POMC II, 虹鳟 POMC B, 海鳗 POC 等 γ -LPH 中插入了一些新的氨基酸, 如虹鳟 POMC A C 端中多了一个可剪切成一个新的十肽

的 25 个氨基酸序列。

将鲇 POMC 前体蛋白序列用来进行同源比对以了解其与不同种属间的同源性,结果表明鲇 POMC 蛋白与同属的美洲斑点叉尾鲷具有较高的相似性,与其他硬骨鱼类的相似性较低。研究表明 POMC 前体蛋白的 α -MSH 是所有种属中最保守的,它在鱼类的生理活动中起着较多的功能作用,如色素的分布、饲喂习惯和能量的平衡,最近的研究表明它与肥胖也有一定关系。Cody 等^[25]对 MSH 一级结构的分析发现:哺乳动物的 α -MSH 和 β -MSH 都具有由“MEHFRWG”7 个氨基酸残基组成的保守结构域。Sahm 等^[26]和 Peng 等^[27]对组成 α -MSH 的氨基酸残基的定位突变分析表明,“MEHFRWG”结构域是 α -MSH 与受体结合的位点,其氨基酸种类的变化影响其与受体结合的能力,该结构域两侧的 3 个氨基酸残基的变化并不影响 α -MSH 与受体的结合及 α -MSH 的生理活性。包括南方鲇在内的鱼类 ACTH、 α -MSH 和 β -内啡肽功能区与其他脊椎动物具有很高的同源性,且 ACTH 和 α -MSH 均具“MEHFRWG”保守结构域,表明鱼类 ACT 和 δ -MSH 的生理功能及其作用方式可能与哺乳动物相同。但是包括南方鲇在内的鱼类 β -MSH 的“MEHFRWG”保守结构域中“E”均发生了替换,在鲇中“E”替换成了“S”,多数鱼类中“E”被“K”替换,该氨基酸残基的变化对 β -MSH 生理活性的影响尚未见报道。 γ -LPH 功能区仅 33 个氨基酸残基,是有报道的物种中氨基酸残基缺失最严重的,以上氨基酸残基的替换和缺失对鲇 β -MSH 和 γ -LPH 生理功能的影响尚有待研究。

POMC 是所有脊椎动物均存在的一种激素前体,鱼类 POMC 基因最具多样性,在系统进化上处于较原始地位的硬骨鱼类(如肺鱼亚纲^[8]、硬骨鱼纲辐鳍亚纲鳃形目^[9]、雀鲷目^[10]),其编码 ACTH 的序列之前具有编码 γ -MSH 的序列,但其 γ -MSH 序列与哺乳动物同源性很低(如雀鲷^[10] γ -MSH 与哺乳动物的同源性仅 26%,且不同种群雀鲷的 γ -MSH 序列也存在明显的差异)。匙吻鲟^[9]具有与哺乳动物相同的 MSH 核心区域“HFRW”和完整

的两侧碱性氨基酸剪切位点,而雀鲷 γ -MSH 仅具不完全的 MSH 核心序列(HFR), γ -MSH 内部存在 5 个氨基酸的缺失,同时其两侧的碱性氨基酸剪切位点亦出现了缺失。软骨鱼类 POMC 不仅具有 γ -MSH 功能区,在 ACTH β -MSH 间还插入了另一个 MSH,即 δ -MSH,出现此现象的原因可能与软骨鱼进化过程中基因的串联倍增和硬骨鱼类中基因的二级丢失有关^[28]。因此,研究 POMC 基因的结构不仅有助于弄清 POMC 来源的生物活性肽的功能,而且有助于研究鱼类的系统进化过程。

3.2 鲇 POMC mRNA 在不同组织中的表达情况

哺乳动物 POMC mRNA 及 POMC 来源多肽主要在垂体表达,此外在胎盘、子宫、性腺、肾上腺、脾和皮肤等多种器官中也有表达,通过自分泌、旁分泌等形式在应激反应、免疫应答和繁殖调控等多种生命活动中发挥作用^[29-30]。鲤 2 种 POMC 基因在脑均有表达^[3],斑点叉尾鲷头肾也较高表达 POMC,胃、脑、脏、肝、脾脏、肌肉和皮肤也有 POMC 的表达但表达量不高^[12],舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)的性腺、肝和肾^[17]以及虹鳟的性腺^[31-32]均有 POMC 基因的表达。对斑点叉尾鲷 ACTH 的放射免疫研究还发现,ACTH 在白细胞中也有表达^[12]。在鱼类 POMC 来源多肽主要参与鱼体色、类固醇激素合成和能量平衡的调节,以及在应激反应和控制摄食中发挥作用^[34]。Karsi 等^[12]认为 POMC 在头肾里高量表达,可能与头肾具免疫功能有关,还认为 POMC 在鱼类性腺表达,可能参与繁殖调控。本研究表明鲇 POMC 基因主要在垂体高量表达,其表达量是其他组织的 2 000 倍以上,在脑、鳃、头肾、胃、胰等组织中亦有表达,但在脑中 POMC 中表达也较高。有关鱼类中枢神经系统中 POMC 基因的表达、POMC 前体蛋白的加工以及 POMC 来源多肽在中枢神经系统中的功能有待深入研究。此外, POMC 基因在鱼类的多种器官中表达,可能与哺乳动物一样,亦是

通过自分泌或旁分泌参与鱼类生命活动的调控。

参考文献:

- [1] 魏平. 垂体内 POMC 基因表达调控研究进展[J]. 国外医学内分泌学分册, 2001, 21(1): 39-41.

- [2] Pritchard L E, Tumbull A V, White A. Proopiomelanocortin Processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signaling and obesity [J]. *J Endocrinol*, 2002, 172:114–121.
- [3] Arends R J, Vermeer H, Martens G J, et al. Cloning and expression of two proopiomelanocortin mRNAs in the common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J].*Mol Cell Endocrinol*, 1998, 143(1-2): 23–31.
- [4] Nakanishi S, Inoue A, Kita T, et al. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotrophin-beta-lipotropin precursor [J]. *Nat Mater*, 1979, 278(5703): 423–427.
- [5] Notake M, Tobimatsu T, Watanabe Y. Isolation and characterization of the mouse corticotrophin- beta-lipotropin precursor gene and a related pseudogene[J].*FBBS*, 1983, 156(1): 67–71.
- [6] Amemiya Y, Takahashi A, Suzuki N, et al. A newly characterization in proopiomelanocortin in pituitaries of an elasmobranch, *Squalus acanthias*[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1999, 114(3): 387–395.
- [7] Amemiya Y, Sogabe Y, Nozaki M, et al. Somatolactin in the white sturgeon and African lungfish and its evolutionary significance[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1999, 114(2): 181–190.
- [8] Dorés R M, Sollars C, Danielson P, et al. Cloning of a Proopiomelanocortin DNA from the pituitary of the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*: analyzing trends in the organization of this prohormone precursor [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1999, 116(3): 433–444.
- [9] Alrubaijan J, Danielson P, Fitzpatrick M, et al. Cloning of a second Proopiomelanocortin cDNA from the pituitary of the sturgeon, *Acipenser transmontanus*[J]. *Peptides*, 1999, 20(4): 431–436.
- [10] Dorés R M, Smith T R, Rubin D A, et al. Deciphering post-translational Processing events in the pituitary of a neopterygian fish: cloning of a gar Proopiomelanocortin cDNA[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1997, 107(3): 401–413.
- [11] Areps R J, Vermeer H, Martens G J, et al. Cloning and expression of two proopiomelanocortin mRNAs in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1998, 143: 23–31.
- [12] Karsi A, Waldbieser G C, Small B C, et al. Molecular cloning of Proopiomelanocortin cDNA and multi-tissue mRNA expression in channel catfish[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2004, 137(3): 312–321.
- [13] Lee J, Danielson P, Sollars C, et al. Cloning of a neoteleost (*Oreochromis mossambicus*) Pro- opiomelanocortin(POMC) cDNA reveals a deletion of the gammamelanotropin region and most of the joining peptide region: implications for POMC processing[J]. *Peptides*, 1999, 20(12): 1391–1399.
- [14] Salbert G, Chauveau, Bonnee G, et al. One of the two trout Proopiomelanocortin messenger mRNAs potentially encodes new peptides [J]. *Mol Endocrinol*, 1992, 6(10): 1605–1613.
- [15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- [16] Varsamos S, Wendelaar Bonga S E, Flik G, et al. Cloning of a proopiomelanocortin cDNA from the pituitary gland of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and assessment of mRNA expression in different tissues by means of real-time PCR [J]. *J Endocrinol*, 2003, 176, 405–414.
- [17] Gonzalez Nunez v, Gonzalez Sanniento R, Rodriguez R E. Identification of two Proopiomelanocortin genes in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Mol Brain Res*, 2003, 120(1): 1–8.
- [18] Okuta A, Ando H, Ueda H, et al. Two types of cDNAs encoding Proopiomelanocortin of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*[J]. *Zool Sci*, 1996, 13(3): 421–427.
- [19] Salbert G, Chauveau I, Bonnee G, et al. One of the two trout proopiomelanocortin messenger RNAs potentially encodes new peptides [J]. *Mol Endocrinol*, 1992, 6(10): 1605–1613.
- [20] Beaudouin E, Freier S, Wyatt J R, et al. Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes [J]. *Genome Res*, 2000, 10, 1001–1010.
- [21] Gilbert E, Veraldi K L, Milcarek C. Alternative poly (A) site selection in complex transcription units: means to an Eptide [J]. *Nucl Acid Res*, 1997, 25: 2547–2561.
- [22] Chang A C, Cochet M, Cohen S N. Structural organization of human genomic DNA encoding the Proopiomelanocortin peptide[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77(8): 4890–4894.
- [23] Martens G J. Expression of two proopiomelanocortin genes in the pituitary gland of venous lavish: complete structures of the two preprohormones [J].*Nucl Acid Res*, 1986, 14(9): 3791–3798.
- [24] Deneff C, Roudbaraki M, van Bael A. Growth and differentiation factors derived from the N-terminal domain of proopiomelanocortin[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2001, 28, 239–243.
- [25] Cody W L, Wilkes B C, Muska B J, et al. Cyclic melanotropins importance of the C-terminal tripeptide (Lys-Pro-Val)[J]. *J Med Chem*, 1984, 27(9): 1186–1190.

- [26] Sahm U G, Olivier G W, Branch S K, et al. Synthesis and biological evaluation of α -MSH analogues substituted with alkaline [J]. *Peptides*, 1994, 15(7): 1297–1302.
- [27] Peng P J, Sahm U G, Doherty R V, et al. Binding and biological activity of C-terminally modified melanocortin peptides: a comparison between their actions at rodent MC1 and MC3 receptors [J]. *Peptides*, 1997, 18(7): 1001–1008.
- [28] Takahashi A, Amemiya Y, Nozaki M, et al. Evolutionary significance of proopiomelanocortin in aganthe and chondrichthyes[J]. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 2001, 129 (2-3): 283–289.
- [29] Slominski A, Wortsman J, Luger T, et al. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress[J]. *Physiol Rev*, 2000, 80(3): 979–1020.
- [30] 冷向军, 李小勤, 韦友传, 等. 饲料中添加叶黄素对胡子鲇体色的影响[J]. *水产学报*, 2003, 2(28): 38–42.
- [31] Mosconi G, Carnevali O, Facchinetti F, et al. Ovarian melanotropic peptides and adaptation in two teleostean species: *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L.[J]. *Peptides*, 1994, 15(5): 927–931.
- [32] 徐伟, 李池陶, 曹顶臣, 等. 水晶彩鲫、红鲫和锦鲤的腹膜脏层黑色素观察[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(1): 144–148.
- [33] Metz J R, Peters J J, Flik G. Molecular biology and physiology of the melanocortin system in fish: a review[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2006, 148(2): 150–162.

Molecular cloning of proopiomelanocortin cDNA and multi-tissue mRNA expression in *Parasilurus asotus*

DING Weidong, CAO Zheming, CAO Liping

Key Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology Certificated by the Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: We investigated the structure, evolution, and tissue specific expression of *Parasilurus asotus* proopiomelanocortin (*POMC*) cDNA using RT-PCR and RACE. The *POMC* cDNA was 1 099 bp in length and contained a 129 bp 5'UTR, a 322 bp 3'UTR, and a 648 bp open reading frame encoding a protein of 215 amino acids. The catfish POMC protein contained a signal peptide (SP, Met¹-Ala²⁸), an N-terminal peptide (Gln²⁹-Asp¹⁰²), adrenocorticotrophic hormone (ACTH, Ser¹⁰⁵-Met¹⁴⁴), α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH, Ser¹⁰⁵-Val¹¹⁷), corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP, Arg¹²³-Met¹⁴⁴), β -lipotropin (β -LPH, Glu¹⁴⁵-Ser¹⁵⁸), β -MSH (Asp¹⁶¹-Ser¹⁷⁷), and β -Endorphin (β -EP, Tyr¹⁷⁸-Leu²¹⁵). Catfish POMC protein does not contain a γ -MSH region and the majority of the joining peptide and part of the γ -LPH were deleted. The protein shared the highest similarity (88%) with channel catfish (*Parasilurus asotus*) POMC. The most highly conserved active peptide was α -MSH, followed by β -MSH, β -EP, and CLIP whereas γ -MSH, joining peptide (JP), and γ -LPH were located in the most divergent region. The protein had a calculated molecular weight of 24.66 kD, a theoretical isoelectric point of 7.25, was hydrophilic in most regions, and was rich in B cell antigenicity positions. Catfish *POMC* mRNA was primarily expressed in the pituitary and the concentration of mRNA was much higher in brain than in other tissues.

Key words: *Parasilurus asotus*; pituitary; proopiomelanocortin

Corresponding author: CAO Liping. E-mail: caolp@ffrc.cn