

尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼及其杂交子代的催乳素I基因克隆及序列分析

孟庆辉, 李思发, 范武江, 王兵

(上海海洋大学 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306)

摘要: 本研究采用RT-PCR方法对生长快、耐盐性弱的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*), 耐盐性强、生长慢的萨罗罗非鱼(*Sarotherodon melanotheron*)以及生长与耐盐均较优的杂交子代(*O. niloticus* ♀ × *S. melanotheron* ♂)的催乳素PRLI基因cDNA序列片段进行了克隆与序列分析, 以探讨罗非鱼耐盐性的分子机制, 分析和筛选与耐盐性相关的基因。主要结果: (1) 序列克隆及ClustalX1.83分析表明克隆所得cDNA序列长度为339 bp, 编码112个氨基酸。(2) 3种罗非鱼PRLI的cDNA具有高度的保守性, 核苷酸序列同源性介于97.94% ~ 99.71%之间, 氨基酸序列同源性均在99.11%以上, 表明罗非鱼的PRLI基因具有高度保守性。(3) 杂交子代同尼罗罗非鱼的cDNA序列相比有5个碱基的变异, 变异比例为1.47%; 同萨罗罗非鱼相比有1个碱基的变异, 变异比例为0.30%。(4) 尼罗罗非鱼推导氨基酸序列中第80位氨基酸残基为脯氨酸残基(P), 而杂交子代和萨罗罗非鱼在该位点均为丝氨酸残基(S)。(5) MEGA4系统进化树分析显示, 杂交子代同萨罗罗非鱼聚为1支。结果(3)、(4)、(5)表明, 在PRLI基因的表达方面, 杂交子代同父本萨罗罗非鱼的关系较近。[中国水产科学, 2010, 17(3): 414-423]

关键词: 罗非鱼; 催乳素PRL; RT-PCR; 克隆; 耐盐性

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)03-0414-10

催乳素(Prolactin, 简称PRL)是由动物脑垂体分泌的一种多肽类激素, 它与脑垂体中的另一种激素——生长激素在生化性质及结构上具有一定的相似性, 均由1个共同的祖先分子进化而来, 隶属于同一个激素家族^[1]。PRL在脊椎动物中具有多种生理作用, 而在鱼类中已知的主要功能是通过改变 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性来调控血浆渗透压的大小, 以调节鱼体渗透压和离子平衡^[2]。罗非鱼的脑垂体分泌2种形式的催乳素: 长链PRL(188个氨基酸残基, 称为PRLI或者tPRL188)和短链PRL(177个氨基酸残基, 称为PRLII或tPRL177), 分别由PRLI和PRLII基因编码。2种催乳素的分子量大小(分别为24 kD和20 kD)和氨基酸数(分别为188和177)均不相同, 功能也有一定差异^[3]。实验表明, 当罗非鱼进入海水

后, 2种PRL的mRNA和血清水平降低, 其中PRLI更明显^[4]。Iwama等^[5]发现, 在1.6倍盐度海水中饲养的罗非鱼, 其血浆中PRLI浓度显著低于在淡水和一般海水中养殖的罗非鱼; 而PRLII则仅在淡水养殖的罗非鱼血浆中才能检测到。Ayson等^[6]和Yada等^[7]报道, 把莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)从海水转移到淡水中, 2种催乳素的mRNA和等离子水平都增加, PRLI增加尤为显著。Shepherd等^[8]和Riley等^[9]对莫桑比克罗非鱼在低渗条件下的实验也显示, PRLI mRNA和等离子水平有显著的增加。本研究选择PRLI作为目的克隆基因是因为它在高渗环境中的渗透调节作用比PRLII更加显著^[4], 而且PRLI比PRLII更加相近于其他鱼类的PRL基因^[10]。

罗非鱼类(Tilapias)隶属于鲷形总目、鲷亚目丽

收稿日期: 2009-08-26; 修订日期: 2009-11-22.

基金项目: 国家科技支撑计划专题(2006BAD01A1203); 罗非鱼产业技术体系(新D-8002-09-0055); 公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-044-01)。

作者简介: 孟庆辉(1983-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与种苗工程. E-mail: qinghui1234@126.com

通讯作者: 李思发, 教授, 博士生导师. E-mail: sfl@shou.edu.cn

鱼科(Cichlidae),共有3个属约70多种,是世界上养殖最为广泛的鱼类之一,而且不少为广盐性种类,既可在淡水中养殖,也可经驯化后在海水中生长^[11]。尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)是国内外养殖最普遍的罗非鱼种类,生长快,个体大,但耐盐性一般,适合在淡水中生长。萨罗罗非鱼(*Sarotherodon melanotheron*)分布于西非各国,是著名的耐盐鱼类,但生长不快,个体小,不适于养殖。为了得到生长速度和耐盐性能兼优的罗非鱼新品种,本实验室利用人工授精和杂交培育的方法得到尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼的杂交子代,并发现其F1能够自然繁殖,具备新品种推广的潜质^[12]。本研究选择尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼及其杂交子代作为研究材料,探讨罗非鱼耐盐性的分子机制,分析和筛选耐盐性相关的基因,以及研究杂交子代与父母代之间在这些基因上的关系,为在分子水平上探讨耐盐性罗非鱼良种选育的机理和技术打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 尼罗罗非鱼(新吉富罗非鱼,2008年繁育,平均体质量20~30 g,体长8~10 cm,上海海洋大学等的选育品种GS01-001-2005)、萨罗罗非鱼(上海海洋大学2002年引进保种亲鱼于2008年自繁的鱼苗,平均体质量18~22 g,体长7~8 cm)、杂交子代(新吉富罗非鱼♀×萨罗罗非鱼♂,2008年繁育,平均体质量20~30 g,体长8~10 cm),样本鱼均是2008年在河北中捷国家级罗非鱼良种场养殖,每种鱼各取40尾,分为1个对照组,3个实验组,每组10尾。3个实验组做慢性致死实验,留最后存活的5条实验鱼,取鳃。鳃取出后,放到10倍体积的RNAstore(天根生化科技有限公司)保存液中,4℃暂存24 h,转入-20℃保存,后存于-80℃冰箱保存。

1.1.2 试剂 RNA保存液来自天根生化,总RNA提取试剂Trizol试剂购自Invitrogen公司, cDNA合成与RT-PCR反应试剂、PrimeScript™ RT-PCR Kit试剂

盒(DRR014A)及PMD19™-T Vector(D102A)连接载体试剂盒由Takara公司生产,胶回收使用的是Bio SpinGel Extraction Kit(博日科技有限公司出产),其余均为国产分析纯试剂。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α由本实验室保存。引物合成与DNA序列测定由上海生工生物工程公司完成。

1.2 方法

1.2.1 引物的合成与RNA的提取 根据GenBank上查找的尼罗罗非鱼PRLI基因序列(登录号TILPROLACA),在其保守区域,用Primer5.0软件设计引物:PRL5F,5'-CTCTCTACAGACGCCCATG-3'; PRL5R,5'-AGGCAGGACAGCAGAAAG-3'。以3种罗非鱼的鳃为材料,各取50 mg左右,提取总RNA,具体步骤参照试剂盒操作手册。电泳检测总RNA的质量。

1.2.2 cDNA的合成与RT-PCR cDNA的合成按照PrimeScript™ RT-PCR Kit试剂盒操作说明进行,具体操作如下:RNase-Free dH₂O 6 μL,10 mmol/L dNTP Mixture 1 μL,2.5 mmol/L Oligo dT Primer 1 μL,总RNA 2 μL,在冰上,于0.2 mL的PCR管中加入上述试剂,在PCR仪上65℃反应5 min,4℃保温。迅速离心,置于冰上,然后加入下列试剂:5×PrimeScript™ buffer 4 μL, RNase-Free dH₂O 5 μL, RNase Inhibitor 40 U/μL 0.5 μL, PrimeScript™ RTase 0.5 μL,在PCR仪上42℃ 30 min,95℃ 5 min,4℃保温,反应结束后,于-20℃保存。

RT-PCR反应体系如下:10×PCR bufferII 5 μL, dNTP Mixture 10 mmol/L 2 μL, Primer-F 0.5 μL, Primer-R 0.5 μL, Takara Ex Taq™ HS 5 U/μL 0.5 μL, cDNA反转录反应液4 μL, RNase-Free dH₂O 37.5 μL, PCR反应程序为:95℃预变性1 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环;72℃ 10 min,4℃保温。反应结束后取5 μL产物,1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 二次PCR、胶回收及测序 电泳检测显示条带不清晰,无法回收。进行二次PCR,100 μL体系包括:2×TaqMasterMix(天根生化)50 μL, Primer-F 1 μL, Primer-R 1 μL,上述反应液2 μL, dH₂O 46 μL,

反应程序同1.2.2。PCR反应结束后,取100 μ L用1.5%的琼脂糖凝胶电泳。回收纯化,连接产物转化到DH5 α 感受态细胞,在X-gal/ IPTG 琼脂平板上挑取白色菌落进行测序分析。

1.2.4 数据分析 将测序所得到的cDNA序列用NCBI网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 的BLASTN和BLASTX软件进行同源基因的搜索,查找与其相关的同源序列;比较3种罗非鱼的cDNA和推测氨基酸序列的差异,氨基酸序列的推断通过Bioedit软件来完成;氨基酸序列同源性比较由ClustalX1.83程序完成。然后用系统发育分析软件MEGA4计算遗传距离并构建邻接树(Neighbor joining tree, NJ tree),分析3种罗非鱼间及同其他鱼类间的亲缘关系。

2 结果与分析

2.1 鳃总RNA的提取

鳃总RNA提取后,用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测显示,28S和18S条带清晰(图1),表明总RNA完整性良好,可用于反转录实验。

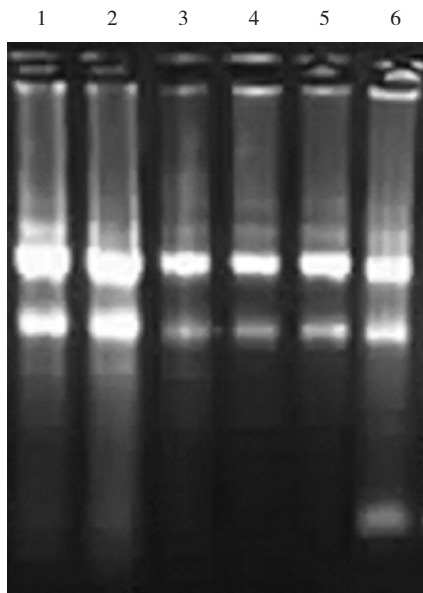


图1 尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼及其杂交子代的鳃总RNA电泳图
1-2: 尼罗罗非鱼; 3-4: 萨罗罗非鱼; 5-6: 杂交子代。

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis examination of total RNA extracted from gill in *Oreochromis niloticus*, *Sarotherodon melanotheron* and their hybrids
1-2: *O. niloticus*; 3-4: *S. melanotheron*; 5-6: hybrids.

2.2 RT-PCR扩增和二次PCR结果

RT-PCR扩增后,1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测显示条带不明显(图2),无法回收。对PCR结果进行二次PCR扩增,获得了显示明显的目的条带(图3)。对这些目的条带割胶回收、纯化,克隆到载体并转化到感受态细胞培养,挑取阳性克隆,测序。

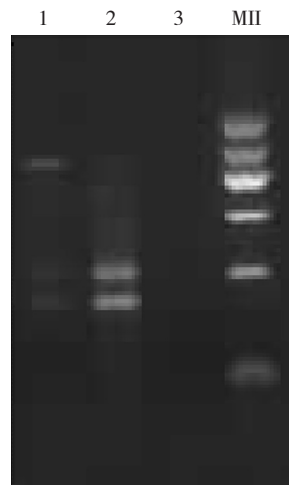


图2 尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼及其杂交子代的RT-PCR扩增电泳检测

1: 尼罗罗非鱼; 2: 萨罗罗非鱼; 3: 杂交子代; MII: 分子量标准。

Fig. 2 Agrose gel electrophoresis examination of RT-PCR in *Oreochromis niloticus*, *Sarotherodon melanotheron* and their hybrids
1: *O. niloticus*; 2: *S. melanotheron*; 3: hybrids; MII: Marker.

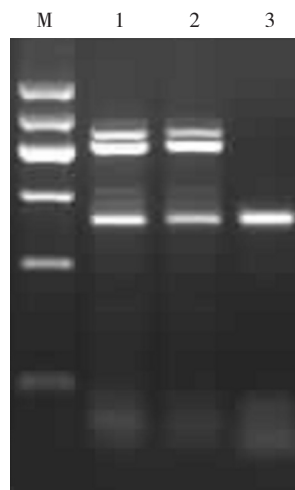


图3 尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼及其杂交子代的二次PCR电泳检测

1: 尼罗罗非鱼; 2: 萨罗罗非鱼; 3: 杂交子代; M: 分子量标准。

Fig. 3 Agrose gel electrophoresis examination of the second PCR in *Oreochromis niloticus*, *Sarotherodon melanotheron* and their hybrids
1: *O. niloticus*; 2: *S. melanotheron*; 3: hybrids; M: Marker.

2.3 测序结果

每个样本选取10个克隆,对测序结果进行比对,综合测序条带峰值和Blast结果确定每个样本序列。结果显示,3种罗非鱼RT-PCR扩增片段大小都

为339 bp(图4),编码112个氨基酸,且含有扩增所用的引物序列,和设计大小相吻合。经过NCBI网上Blast分析,确定为3种罗非鱼的PRL序列。

ON	C	TCT	CTA	CAG	ACG	CCC	ATT	GAC	AAG	GAC	CAA	GCA	CTT	CAA	GTG	TCA	GAG
HB	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...
SM	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...
ON	TCA	GAT	TTG	ATG	TCC	CTG	GCT	CGC	TCC	CTC	CTC	CAA	GCC	TGG	TCA	GAC	
HB	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...
SM	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...
ON	CCT	CTC	GTA	GTC	CTG	TCC	TCC	TCC	GCT	AGT	ACC	CTG	CCT	CAC	CCA	GCA	
HB	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...
SM	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...
ON	CAA	AGC	ACC	ATA	TTC	AAC	AAG	ATC	CAG	GAG	ATG	CAG	CAG	TAC	TCC	AAA	
HB	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
SM	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
ON	AGT	CTC	AAG	GAT	GGC	CTG	GAT	GTA	CTA	TCT	AGT	AAG	ATG	GGT	TCA	CCT	
HB	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	...	...	..T	...
SM	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	...	...	..T	...
ON	GCT	CAG	GCC	ATC	ACT	TCA	CTG	CCC	TAC	CGA	GGA	GGC	ACC	AAC	CTC	GGC	
HB	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...
SM	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...
ON	CAT	GAC	AAG	ATC	ACC	AAG	TTG	ATC	AAC	TTC	AAC	TTT	CTG	CTG	TCC	TGC	
HB	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
SM	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
ON	CT																
HB	..																
SM	..																

图4 尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼及其杂交子代PRLI cDNA片段的核苷酸序列测定结果

“.”表示与尼罗罗非鱼相同的碱基;ON: 尼罗罗非鱼;HB: 杂交子代;SM: 萨罗罗非鱼。

Fig. 4 Sequences of partial PRLI cDNA in *Oreochromis niloticus* (ON), *Sarotherodon melanotheron* (SM) and their hybrids (HB)

“.”: Dots donate the identical nucleotides with *Oreochromis niloticus*.

2.4 核苷酸和氨基酸同源性的比较

利用Bioedit推导3种罗非鱼的氨基酸序列(图5),通过ClustalX1.83将这3种罗非鱼的PRLI cDNA片段的核苷酸序列和氨基酸序列与NCBI上已报道的其他鱼类进行比对。发现尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼、杂交子代及莫桑比克罗非鱼这4种罗非鱼之间的PRLI cDNA具有高度的保守性,4种罗非鱼核苷酸的同源性介于97.94%~99.71%之间。其中,萨罗罗非鱼和莫桑比克罗非鱼之间同源性最低,为97.94%;尼罗罗非鱼与莫桑比克罗非鱼之间、杂交子代与萨罗罗非鱼之间的同源性为99.71%;杂交子代与尼罗罗非鱼之间的同源性为98.53%,低于杂交子代与萨罗罗非鱼间的同源性。4种罗非鱼之间的氨基酸序列同源性都在99.11%以上,其中杂交子代与尼罗罗非鱼之间有99.11%的同源性。而杂交子代与萨罗罗非鱼推导出的112个氨基酸残基相同(图5)。尼罗罗非鱼、萨罗

罗非鱼、杂交子代3种罗非鱼与其他鱼类相比,在核苷酸序列和氨基酸序列上则表现出较高的变异:核苷酸序列同源性介于61.36%~80.53%之间,氨基酸序列同源性介于53.57%~77.68%之间。

2.5 PRLI基因序列的多态性分析

利用Bioedit分析杂交子代及父母代的序列多态性。3种罗非鱼的共有多态位点为6个,比例为1.77%。其中尼罗罗非鱼有多态位点5个,比例为1.47%;萨罗罗非鱼有多态位点1个,比例为0.3%;杂交子代同尼罗罗非鱼相比有5个碱基的变异,变异比例为1.47%;同萨罗罗非鱼相比有1个碱基的变异,变异比例为0.3%;分析发现3种罗非鱼的碱基组成有较大差别:T碱基含量3种罗非鱼相同;C碱基含量在尼罗罗非鱼最高,杂交子代和父本萨罗罗非鱼相同;A碱基含量杂交子代和母本相同,都高于萨罗罗非鱼;G碱基含量和G+C含量在萨罗罗非鱼最高(表1)。

ON	SLQTPIDKDQALQVSESDLSLARSLQAWSDPLVVLSSSASTLPHPAQSTIFNKI
HB	SLQTPIDKDQALQVSESDLSLARSLQAWSDPLVVLSSSASTLPHPAQSTIFNKI
SM	SLQTPIDKDQALQVSESDLSLARSLQAWSDPLVVLSSSASTLPHPAQSTIFNKI
ON	QEMQQYSKSLKDGLDVLSSKMGSPAQAITSLPYRGGTNLGHDKITKLINFNLLSC
HB	QEMQQYSKSLKDGLDVLSSKMGSSAQAITSLPYRGGTNLGHDKITKLINFNLLSC
SM	QEMQQYSKSLKDGLDVLSSKMGSSAQAITSLPYRGGTNLGHDKITKLINFNLLSC

图5 根据尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼及其杂交子代 *PRLI* cDNA 片段序列推导的氨基酸序列的比较
ON: 尼罗罗非鱼; HB: 杂交子代; SM: 萨罗罗非鱼.

Fig. 5 Comparative analysis for amino acid sequences deduced from cDNA sequences in *Oreochromis niloticus* (ON), *Sarotherodon melanotheron* (SM) and their hybrids (HB)

表1 尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼及其杂交子代罗非鱼 <i>PRLI</i> cDNA 片段的碱基组成					
Tab.1 Base composition of <i>PRLI</i> in <i>Oreochromis niloticus</i> , <i>Sarotherodon melanotheron</i> and their hybrids					
物种 Species	T	C	A	G	A+T
尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	22.7	33.3	24.5	19.5	47.2
杂交子代 Hybrids	22.7	33.0	24.5	19.8	47.2
萨罗罗非鱼 <i>S. melanotheron</i>	22.7	33.0	24.2	20.1	46.9

2.6 遗传距离的估计和NJ树的构建

基于表2所列的22种鱼类 *PRL* 基因的核苷酸和氨基酸序列,重复抽样次数为1 000,利用MEGA4估计遗传距离(表3)和构建NJ树(图6)。表3显示,杂交子代与尼罗罗非鱼之间的遗传距离大于杂交子代与萨罗罗非鱼之间的遗传距离,而父母本萨罗罗非鱼与尼罗罗非鱼之间的遗传距离大于杂交子代与亲

本之间的遗传距离。22种鱼类的NJ树显示,与其他鱼类相比,3种罗非鱼同与莫桑比克罗非鱼的遗传距离最小,杂交子代与萨罗罗非鱼聚为一小支,尼罗罗非鱼与莫桑比克罗非鱼聚为另一小支;罗非鱼类与鲈形目的遗传距离较近,聚为一个大支;罗非鱼类与鲑形目鱼类的遗传距离较远,与鲤形目鱼类的遗传距离则最远。

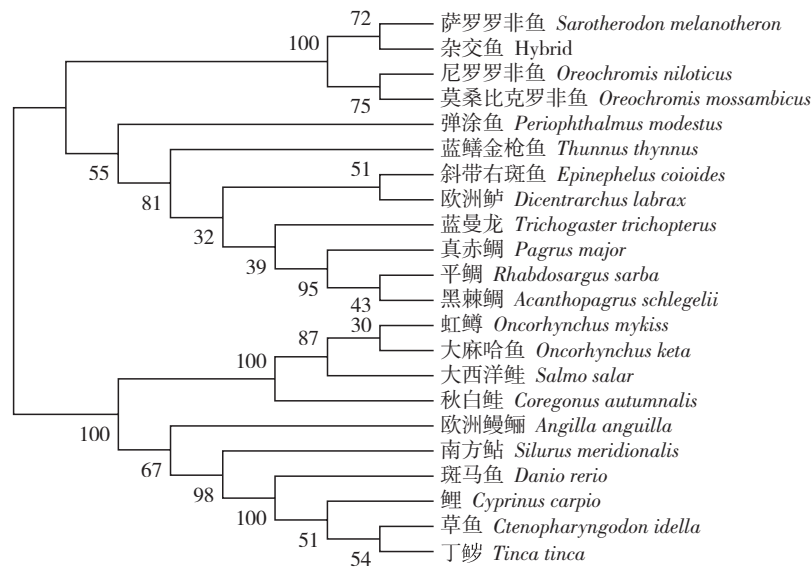


图6 基于22种鱼类PRL氨基酸序列构建的NJ树
节点数字表示自举系数.

Fig. 6 NJ tree based on PRL amino acid sequences of 22 fish species
Figures on the nodes indicate the bootstrap values.

表2 22种鱼类PRL序列的基因登录号
Tab. 2 GenBank accession number of PRL gene of 22 fish species

编号 No.	物种名 Species	NCBI登录号 NCBI accession No.
1	草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	EU074210
2	黑棘鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i>	AY929158
3	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NM_181437
4	大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	NM_001123668
5	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	NM_001124733
6	平鲷 <i>Rhabdosargus sarba</i>	DQ202396
7	南方鲈 <i>Silurus meridionalis</i>	EU177781
8	丁鲷 <i>Tinca tinca</i>	DQ996465
9	真赤鲷 <i>Pagrus major</i>	AB219243
10	弹涂鱼 <i>Periophthalmus modestus</i>	AB089194
11	蓝鳍金枪鱼 <i>Thunnus thynnus</i>	AB222035
12	蓝曼龙 <i>Trichogaster trichopterus</i>	AY765377
13	欧洲鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	X78723
14	秋白鲑 <i>Coregonus autumnalis</i>	Z23114
15	大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus keta</i>	X64036
16	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	X12543
17	欧洲鳗鲡 <i>Angilla anguilla</i>	X69149
18	斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	AY169407
19	莫桑比克罗非鱼 <i>Oreochromis mossambicus</i>	X92380
20	萨罗罗非鱼 <i>Sarotherodon melanotheron</i>	GQ359823
21	尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	本文
22	杂交鱼 Hybrid	本文

注: 除最后3种鱼外, 本文引用的序列都来源于NCBI; 萨罗罗非鱼的登录号为本研究提交。

Note: All gene sequences are from NCBI except for the last three species. NCBI accession No. of *S. melanotheron* was submitted by the present study.

3 讨论

3.1 尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼及其杂交子代PRLI cDNA序列异同性

本实验成功克隆出了尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼及其杂交子代的PRLI cDNA片段, 其中萨罗罗非鱼和杂交子代的PRLI cDNA克隆为首次。比对结果显示, 杂交子代与两亲本及参考物种莫桑比克罗非鱼之间的核苷酸和氨基酸的同源性都在97%以上, 表明PRLI基因具有高度保守性。序列比较发现, 杂交子代同尼罗罗非鱼相比有5个碱基的变异, 变异比例为1.47%; 同萨罗罗非鱼相比有1个碱基的变异, 变异比例为0.3%, 表明杂交鱼同母本尼罗罗非鱼之间的变异较大, 同父本萨罗罗非鱼之间的遗传关系较近。

根据产卵习性的差异, Trewavas^[13]把罗非鱼

分为底质产卵的罗非鱼属(*Tilapia*), 雌亲口育的*Oreochromis*属和雄亲口育的*Sarotherodon*属, 这种分类方法得到了较广泛的认可。利用同工酶的方法, Pouyaud等^[14]和Sodsuk等^[15]分析了这3个属的36种罗非鱼的系统关系, 证实了Trewavas的分类方法, 并认为*Oreochromis*和*Sarotherodon*属起源于罗非鱼属。

MEGA4系统进化树分析显示, 萨罗罗非鱼与尼罗罗非鱼分属不同的一支, 印证了尼罗罗非鱼和萨罗罗非鱼亲缘关系较远, 归于不同属的观点。杂交子代与萨罗罗非鱼聚为一支, 表明杂交种遗传距离近于萨罗罗非鱼, 远于尼罗罗非鱼。这与李学军等^[16]用微卫星方法研究发现的尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼的正交和反交子代都与父本萨罗罗非鱼的遗传关系较近这一结果相一致。

表3 22种鱼类PRL氨基酸序列的两两遗传距离
Tab. 3 Pairwise genetic distance among 22 fish species based on their PRL amino acid sequences

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	—																					
2	0.36826	—																				
3	0.11677	0.36826	—																			
4	0.32335	0.30240	0.32635	—																		
5	0.32335	0.29940	0.32635	0.00898	—																	
6	0.37425	0.05389	0.38024	0.30240	0.29940	—																
7	0.24251	0.33533	0.23952	0.29341	0.29042	0.32934	—															
8	0.02994	0.37126	0.11377	0.33234	0.33234	0.37425	0.24850	—														
9	0.37126	0.05988	0.37425	0.30539	0.30240	0.06587	0.34431	0.37425	—													
10	0.38922	0.29641	0.38323	0.35928	0.35928	0.28443	0.39222	0.39222	0.29641	—												
11	0.36826	0.15868	0.37425	0.33234	0.32635	0.15868	0.36527	0.36826	0.15269	0.29641	—											
12	0.39820	0.14371	0.38024	0.33533	0.33234	0.15868	0.35928	0.40120	0.14970	0.28144	0.17365	—										
13	0.38922	0.14371	0.38024	0.32335	0.32635	0.14970	0.35030	0.38922	0.14072	0.31138	0.18263	0.18563	—									
14	0.32335	0.28443	0.32934	0.03593	0.03593	0.29042	0.29042	0.33234	0.29341	0.36228	0.32335	0.32036	0.32036	—								
15	0.32635	0.30240	0.32934	0.01198	0.00299	0.30240	0.29042	0.33533	0.30539	0.36228	0.32934	0.33533	0.32934	0.03892	—							
16	0.07485	0.35529	0.10479	0.32934	0.32934	0.35928	0.24551	0.07186	0.36228	0.37725	0.37425	0.37725	0.38024	0.32635	0.33234	—						
17	0.33533	0.37126	0.33234	0.25449	0.25449	0.39222	0.31138	0.33832	0.37725	0.41018	0.39820	0.38922	0.38922	0.25150	0.25749	0.32934	—					
18	0.33832	0.13473	0.33832	0.30240	0.29940	0.14671	0.31138	0.33832	0.14371	0.27246	0.14671	0.14970	0.16467	0.29042	0.30240	0.32335	0.35928	—				
19	0.37725	0.22156	0.38024	0.32635	0.32335	0.21856	0.35629	0.38922	0.21257	0.33533	0.20060	0.23952	0.22754	0.31437	0.32635	0.38024	0.37725	0.19760	—			
20	0.37725	0.22156	0.38024	0.32635	0.32335	0.21856	0.35629	0.38922	0.21257	0.33533	0.20060	0.23952	0.22754	0.31437	0.32635	0.38024	0.37725	0.19760	0.01796	—		
21	0.38024	0.21557	0.38323	0.31737	0.31437	0.21557	0.34731	0.39222	0.21257	0.33832	0.20659	0.23353	0.22754	0.30539	0.31737	0.38024	0.37425	0.19760	0.01796	0.01796	—	
22	0.37725	0.21557	0.38024	0.31737	0.31437	0.21557	0.35030	0.38922	0.21257	0.33832	0.20659	0.23353	0.22754	0.30539	0.31737	0.37725	0.37725	0.19760	0.01497	0.01497	0.00299	—

注: 鱼的种类及其对应编号见表2。

Note: Fish species and corresponding codes are shown in Fig. 2.

3.2 尼罗罗非鱼、萨罗罗非鱼与杂交子代PRL氨基酸残基变异及保守序列分析

用ClustX1.83进行多重序列比对分析发现,杂交子代和父本萨罗罗非鱼之间的氨基酸序列同源性为100%,但是与母本尼罗罗非鱼之间有1个氨基酸残基的差异,即尼罗罗非鱼第80位氨基酸残基为脯氨酸残基(Pro),而萨罗罗非鱼和杂交子代的第80位氨基酸残基都为丝氨酸残基(Ser),也表明杂交子代同父本萨罗罗非鱼之间的遗传关系较近。

Sawyer等^[17]用PRL处理切除了垂体的鳉科小鱼,发现它们仍然可以在淡水中生存。Seale等^[18]也发现,PRL释放量增加时,细胞外渗透压浓度下降。PRL对鱼类渗透压的调节,尤其是鱼类淡水适应起主要作用。Anna等^[19]对平鲷(*Rhabdosargus sarba*)在低盐度和淡水环境中其垂体PRL mRNA水平进行了研究,发现在低盐度环境中垂体PRL mRNA水平明显高于淡水中。Thorleifur等^[20]把大西洋鲑(*Salmo salar*)从淡水转移到海水中养殖,发现PRL的mRNA表达明显上升。在不同盐度里,PRL表达的水平也会发生变化,Raúl等^[21]对金头鲷(*Sparus auratus*)在低盐度、中盐度及海水3种盐度条件下的PRL表达水平进行分析,发现随着盐度的降低,PRL表达水平越来越高,且在低盐度水中和海水中的表达水平差异显著。PRL表达水平不但在不同盐度中会有差异,在不同的组织里也有差异,Scott等^[22]就发现,黄金鲈(*Perca flavescens*)的PRL在垂体中的表达水平要高于鳃和大脑等组织。耐盐性实验表明,杂交鱼最适宜的生长盐度为20~25,且在这一盐度范围内日均增重率为尼罗罗非鱼0盐度时的75%左右,为萨罗罗非鱼盐度25时的4倍左右^[23],说明杂交鱼的渗透调节能力和耐盐性明显强于母本尼罗罗非鱼。Fisone等^[24]发现罗非鱼 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 亚基上的某些Ser位点能够降低或者抑制 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性。杂交鱼与萨罗罗非鱼的Ser残基相对于同一位点尼罗罗非鱼的Pro残基的变化,是否就是在高渗环境中抑制PRL释放,进而提高了高盐度下机体渗透调节的水平和耐盐能力的原因?这仍需进一步研究。

Rentier-Delrue等^[25]对尼罗罗非鱼的PRLI cDNA全长的研究也发现,其PRLI氨基酸序列与莫桑比克罗非鱼之间也存在2个氨基酸残基的变化,尼罗罗非鱼的Phe7和Thr100分别被莫桑比克罗非鱼的Leu7和Ser100所代替,但认为可能与种属的特异性有关。

根据本研究克隆所得的PRLI cDNA序列推导的氨基酸共112个残基。经Bioedit软件分析,这段氨基酸序列大致位于罗非鱼PRLI氨基酸编码区的中间部分。比对发现,鱼类的PRL基因具有高度的保守性,这与Martin等^[26]所研究的大西洋鲑的催乳素基因序列结果相似。罗非鱼与其他鱼类一样,PRLI的5'端信号肽裂解位点具有高度的保守性;而各序列间(包括不同罗非鱼间和与其他鱼类间的对比)存在的多个SNP位点及氨基酸的变化主要集中在下游编码区。由于本实验未得到可编码188个氨基酸的罗非鱼PRLI基因的cDNA全长,因此未对其3'端序列进行SNP位点及氨基酸变化的分析。

本实验运用RT-PCR方法首次克隆了杂交鱼(尼罗罗非鱼♀×萨罗罗非鱼♂)与其父本萨罗罗非鱼的PRLI基因(GenBank中序列号GQ359823)cDNA片段,并进行了序列分析,目的是在分子和基因水平上探讨罗非鱼耐盐性的作用机理,为罗非鱼耐盐相关基因研究提供理论支持。今后罗非鱼耐盐性的研究还可考虑进行PRLI基因3'端SNP的研究。虽然SNP位点没有影响其编码蛋白质的性质,但很可能在生物体的繁衍、进化、遗传以及环境适应方面具有重要的意义,还可为本研究中几种罗非鱼的PRL全序列的克隆、半定量RT-PCR以及Real-time PCR等技术在罗非鱼中的应用研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Tatsuya S, Stephen D M. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation [J]. Gen Comp Endocrinol, 2006, 147: 24-30.
- [2] 陈松林. 鱼类多肽激素基因工程研究进展及展望[J]. 水产学报, 1993, 17(3): 264-271.
- [3] 左映平, 曹劲松. 鱼类体内催乳素的渗透调节作用[J]. 生命的化学, 2007, 27(5): 455-457.
- [4] Auferin B, Rentier D F, Martial J A, et al. Evidence that two tilapia

- (*Oreochromis niloticus*) prolactins have different osmoregulatory functions during adaptation to a hyperosmotic environment [J]. *J Mol Endocrinol*, 1994, 12: 13–24.
- [5] Iwama G K, Takemura A, Takano K. Oxygen consumption rates of tilapia in fresh water, seawater, and hypersaline sea water [J]. *J Fish Biol*, 1997, 51: 886–894.
- [6] Ayson F G, Kaneko T, Hasegawa S, et al. Different expression of two prolactin and growth hormone genes during early development of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in fresh water and seawater: implication for possible involvement in osmoregulation during early life stage [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1994, 95: 143–152.
- [7] Yada T, Hirano T, Grau E G. Changes in plasma levels of two prolactins and growth hormone during adaptation to different salinities in the euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1994, 93: 214–223.
- [8] Shepherd B S, Sakamoto T, Hyodo S, et al. Is the primitive regulation of pituitary prolactin tPRL sub (177) and tPRL sub (188) secretion and gene expression in the euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) hypothalamic or environmental [J]. *J Endocrinol*, 1999, 161 (1): 121–129.
- [9] Riley L G, Richman N H III, Hirano T, et al. Activation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis by treatment with 17 α -methyltestosterone and seawater rearing in the tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2002, 127: 285–292.
- [10] Yamaguchi K, Specker J L, King D S, et al. Complete amino acid sequences of a pair of fish (tilapia) prolactins, tPRL177 and tPRL188 [J]. *Biol Chem*, 1988, 263: 9113–9121.
- [11] 林苑春, 叶富良. 温度对尼罗罗非鱼急性耐盐性的影响 [J]. *广东海洋大学学报*, 2007, 27 (4): 35–37.
- [12] 李思发, 颜标, 蔡完其, 等. 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼正反交鱼自繁后代F₂耐盐性、生长性能及亲本对杂种优势贡献力的评估 [J]. *水产学报*, 2008, 32 (3): 335–340.
- [13] Trewavas E. *Tilapia* and *Sarotherodon* [J]. *Buntbarsche Bull*, 1980, 81: 1–6.
- [14] Pouyaud L, Agnese J F. Phylogenetic relationships between 21 species of three tilapiine genera *Tilapia*, *Sarotherodon* and *Oreochromis* using allozyme data [J]. *J Fish Biol*, 1995, 47 (1): 26–38.
- [15] Soduck P, McAndrew B J. Molecular systematics of three tilapiine genera *Tilapia*, *Sarotherodon* and *Oreochromis* using allozyme data [J]. *J Fish Biol*, 1991, 39 (suppl A): 301–308.
- [16] 李学军, 李爱景, 王阅文, 等. 萨罗罗非鱼与尼罗罗非鱼正反交子代间的分子遗传学差异 [J]. *四川动物*, 2008, 27 (5): 777–780.
- [17] Sawyer W H, Pickford G E. Neurohypophyseal principles of *Fundulus heteroclitus*: Characteristics and seasonal changes [J]. *Science*, 1959, 130 (5): 454–455.
- [18] Seale A P, Fiess J C, Hirano T, et al. Disparate release of prolactin and growth hormone from the tilapia pituitary in response to osmotic stimulation [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2006, 145 (3): 222–231.
- [19] Anna K Y K, Norman Y S W. Prolactin-releasing peptide, a possible modulator of prolactin in the euryhaline silver sea bream (*Sparus sarba*): A molecular study [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, 158: 154–160.
- [20] Thorleifur A, Kristina S, Tatsuya S, et al. Pituitary gene expression of somatolactin, prolactin, and growth hormone during Atlantic salmon parrsmolt transformation [J]. *Aquaculture* 2003, 222: 229–238.
- [21] Raúl L-C, Juan F, Begona R, et al. Expression of pituitary prolactin, growth hormone and somatolactin is modified in response to different stressors (salinity, crowding and food-deprivation) in gilthead seabream *Sparus auratus* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2009, 162: 293–300.
- [22] Scott G L, Brian S S. Molecular characterization and sex-specific tissue expression of prolactin, somatolactin and insulin-like growth factor-I in yellow perch (*Perca flavescens*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2007, Part B 147: 412–427.
- [23] 李思发, 颜标, 蔡完其, 等. 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼正反交后代耐盐性能的杂种优势及其与遗传的相关性的SSR分析 [J]. *中国水产科学*, 2008, 15 (2): 189–196.
- [24] Fisone G, Cheng S X, Nairn A C, et al. Identification of the phosphorylation site for cAMP-dependent protein kinase on Na-K-ATPase and effects of site-directed mutagenesis [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 9368–9373.
- [25] Rentier-Delrue F, Swennen D, Prunet P, et al. Tilapia prolactin: Molecular cloning of two cDNAs and expression in *Escherichia coli* [J]. *DNA*, 1989, 8 (4): 261–270.
- [26] Martin S A M, Youngson A F, Ferguson A. Atlantic salmon (*Salmo salar*) prolactin cDNA sequence and its mRNA expression after transfer of fish between salinities [J]. *Fish Physiol Biochem*, 1999, 20: 351–359.

***PRLI* gene cloning and sequence analysis of *Oreochromis niloticus*, *Sarotherodon melanotheron* and their hybrid**

MENG Qinghui, LI Sifa, FAN Wujiang, WANG Bing

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization, Certificated by Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: PRLI is an important osmoregulation hormone, which belongs to GH/PRL/SL hormone family. Its most important role in tilapia is to change the osmotic pressure of plasma through changing the activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$. Through crossbreeding we got a new hybrid between *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron*. The hybrid grows faster than the male parent and shows a stronger osmoregulation ability than the female parent. In order to explore the molecular mechanism of salinity tolerance of tilapia, learn and screen the related genes about salinity tolerance, through RT-PCR we cloned and analyzed the cDNAs encoding prolactin from *O. niloticus* characterized by fast growth but low salinity tolerance, from *S. melanotheron* characterized by high salinity tolerance but slow growth and from their hybrid characterized by ideal growth and salinity tolerance. First, we used the Trizol methods to extracted total RNA, then reverse translate the mRNA to cDNA. Through Polymerase Chain Reaction (PCR) the sequence of PRLI was amplified. Then the sequence was cloned to *Escherichia coli* and sequenced. And the PRLI nucleotide and amino acid sequence were analyzed. Major results are as follows: (1) The sequence cloning and Clustal X1.83 analysis showed that PRL of three genotypes of tilapia consists of 339 bp and encodes a putative protein of 112 amino acids. (2) There was 97.94%–99.71% identity in nucleotide sequence, over 99.11% identity in amino acid sequence among three genotypes of tilapia, indicating high conservation of PRLI gene in tilapias. (3) In hybrid vs *O. niloticus*, there were five varieties in nucleotide with 1.47% in proportion; In hybrid vs *S. melanotheron*, there were one variety, with 0.3% in proportion. (4) On the amino acid sequence the 80th point in *O. niloticus* was proline residue (Pro), but in *S. melanotheron* and hybrid it was serine residue (Ser). (5) Phylogenetic tree of MEGA4 showed that the hybrid and *S. melanotheron* were clustered into one group. Results (3), (4) and (5) jointly indicate that the hybrid is closer to its paternal line. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(3): 414–423]

Key words: tilapia; prolactin; RT-PCR; clone; salinity tolerance

Corresponding author: LI Sifa. E-mail: sfli@shou.edu.cn