

DOI: 10.12264/JFSC2022-0182

梭鲈 GH 基因序列特征及其在生长差异个体间的表达分析

周佳^{1,2}, 孙志鹏¹, 吕伟华¹, 曹顶臣¹, 鲁翠云^{1,2}, 刘天奇¹, 吉宇丹^{1,2}, 郑先虎^{1,2}

1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 淡水鱼类育种国家地方联合工程实验室, 农业农村部淡水水产生物技术与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070;
2. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306

摘要: 本研究旨在克隆梭鲈(*Sander lucioperca*)生长激素(growth hormone, GH)基因, 探究其序列特征及其表达量与梭鲈生长的相关性, 以期为梭鲈生长的分子机理研究鉴定基础。研究采用 RACE 技术从梭鲈垂体中克隆了 GH 基因, 其 cDNA 全长为 926 bp, 包含 74 bp 的 5'非翻译区、237 bp 的 3'非翻译区和编码 204 个氨基酸的开放阅读框。氨基酸多重比对发现, 梭鲈 GH 与黄金鲈(*Perca flavescens*)、河鲈(*Perca fluviatilis*)的氨基酸序列相似性分别为 97.04%和 94.05%, GH 基因在鱼类和哺乳动物中都存在四个保守的半胱氨酸残基位点。应用实时荧光定量 PCR 技术分析了 GH 基因在梭鲈各组织和体重极端差异个体间的表达特征, 结果显示, GH 基因在梭鲈各组织中均有表达, 垂体中相对表达量最高, 脑次之, 与其他组织相比差异极显著($P<0.01$)。GH 基因表达量与梭鲈体重呈正相关, 4 个组织中 GH 基因表达量均为体重极大组高于极小组, 其中垂体和脑中差异极显著($P<0.01$), 肌肉中差异显著($P<0.05$)。因此, GH 基因可以作为梭鲈生长候选基因用于分子选择。本研究结果可为进一步解析 GH 基因调控梭鲈生长发育的分子机制研究提供参考。

关键词: 梭鲈; GH 基因; 序列特征; 生长; 表达差异

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)10-1397-10

硬骨鱼类生长调控的核心是生长轴, 即生长激素(GH)/胰岛素样生长因子(IGF)。GH 为脑垂体前叶释放的一种单链多肽类激素, 通过生长激素受体(GHR)刺激肝脏等组织分泌 IGFs, 进而发生生物学效应^[1]。GH 居于生长轴中心位置, 在鱼类的生长、代谢、生殖等生理功能中发挥着重要作用^[2-4]。研究表明, 鱼类 GH 基因的表达水平受性别^[5-6]、季节^[7]和生理状态^[8]等影响, 且研究结果显示在一定条件下 GH 基因表达水平高的鱼类其生长速度也快。如体重大生长快的银鲌(*Pampus argenteus*)垂体 GH 基因表达量是体重小生长慢个体的 612 倍^[9], 极大组赤眼鲮(*Squaliobarbus curriculus*)垂体 GH 基因表达量是极小组的 2.1 倍^[10]。因此,

GH 已成为研究鱼类生长性能的重要候选基因。

梭鲈(*Sander lucioperca*)属于鲈形目(Perciformes)、鲈科(Bacalao)、梭鲈属, 因其体肥肉厚、营养丰富、肉质细嫩、味道鲜美, 素有“淡水鱼王”之称。研究显示, 梭鲈肌肉蛋白质含量为 21.03%, 多不饱和脂肪酸含量为 45.67%, EPA 和 DHA 含量达 30.66%^[11], 总氨基酸、多不饱和脂肪酸、DHA 和 EPA 均高于加州鲈(*Micropterus salmoides*)和鳊(*Siniperca chuatsi*)^[12]。梭鲈因其营养价值高、生长速度快、抗病力强等特点, 深受广大消费者和养殖者的喜爱, 目前在东北、西北、华北、华东、华南等地区均有养殖, 已成为我国重要的淡水名优养殖鱼类。但养殖过程中出现梭

收稿日期: 2022-05-25; 修订日期: 2022-07-20.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(HSY202009Q); 国家重点研发计划项目(2019YFD0900405); 中央引导地方科技发展专项(ZY21C03).

作者简介: 周佳(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产生物技术与遗传育种. E-mail: zhouliaojia0426@163.com

通信作者: 郑先虎, 研究员, 研究方向为水产生物技术与遗传育种. E-mail: zhengxianhu@hrfri.ac.cn

鲈生长差异较大,导致出塘规格悬殊,一定程度上影响了梭鲈养殖业发展。因此,开展梭鲈生长调控的机制研究为遗传改良提供理论依据具有重要的实践意义。关于梭鲈生长性状遗传研究报道较少,韩晓飞^[13]获得了 5 个与梭鲈生长性状显著相关的微卫星标记;Teng 等^[14]克隆了 IGF-I、IGF-II 和 GHR 基因,并在 IGF-II 中获得 1 个 SNP 与体重显著相关。本研究以生长轴 GH 基因入手,获得了 GH 基因 cDNA 全长序列并分析了序列特征,研究了其在梭鲈各组织的表达分布,分析了其表达量与梭鲈生长之间的相关性,探索 GH 基因在梭鲈生长性状中可能的遗传调控作用和分子育种潜力,旨在为梭鲈生长性状的分子选育研究提供候选基因资源。

1 材料与方法

1.1 样品制备

梭鲈样本均来自黑龙江水产研究所呼兰试验场,选取同池塘养殖条件下的 5 尾 1 龄鱼,体重 151~169 g,采取心、肝、脾、脑、垂体、肌肉、肠、胃、皮肤、鳃组织,迅速放入液氮保存。随机选取同池塘养殖条件下 5 月龄梭鲈 500 尾,挑选体重极大和极小个体各 10 尾(表 1),极小组(体长 92.35~101.89 mm,体重 6.6~9.7 g)和极大组(体长 160~185 mm,体重 33~58.4 g),分别采集垂体、脑、肌肉、肝立即放于液氮中冷冻保存。依

表 1 梭鲈体重和体长性状统计

Tab. 1 Statistics of body weight and body length characters of *Sander lucioperca*

编号 number	极小组 small group (n=10)		极大组 big group (n=10)	
	体重/g body weight	体长/mm body length	体重/g body weight	体长/mm body length
1	6.6	92.35	52.0	185
2	9.7	101.89	33.0	164
3	8.2	100.58	78.4	180
4	8.7	100.12	43.2	169
5	8.2	97.14	40.2	160
6	6.6	93.62	48.3	165
7	6.1	94.62	49.7	150
8	5.1	87.12	57.0	170
9	6.0	86.07	46.8	160
10	4.9	88.62	43.6	155

据 ThermoFisher 公司提供的 TRIzol Reagent 试剂盒说明书操作,提取梭鲈各组织样品的总 RNA;利用 NanoDropTM 8000 分光光度计和 1.2%的琼脂糖电泳对 RNA 样品进行浓度和质量检测。

1.2 基因全序列的克隆

以垂体 RNA 为模板,根据 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒说明书反转录为 cDNA 第一链(TaKaRa, 日本)。根据 NCBI 数据库亲缘关系较硬骨鱼类的 GH 基因序列,选择保守区域和梭鲈转录组数据库进行序列比对,获得梭鲈 GH 基因的部分 cDNA 序列并设计引物进行序列验证(表 1)。根据已获得梭鲈 GH 基因保守区域的序列设计 RACE 扩增引物(表 1),按照 SMARTer[®]RACE5'/3'试剂盒(TaKaRa, 日本)说明书构建 RACE 文库,Seq-AmpTM DNA Polymerase (TaKaRa, 日本)试剂盒进行巢式 PCR 扩增。

PCR 产物使用 1.2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,对目的条带切胶后按照琼脂糖胶回收试剂盒回收纯化目的产物(康为世纪,中国),将纯化后的 PCR 产物连接到 pMD18-T 克隆载体(TaKaRa, 日本),转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞(TaKaRa, 日本),涂布在含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱过夜,次日进行菌落 PCR 鉴定,筛选出阳性克隆送至苏州金唯智生物科技有限公司测序。测序结果使用 BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 比对, DNAMAN 软件分析, Staden 1.7 软件进行拼接,最终获得 GH 基因的全长 cDNA 序列。

1.3 推测蛋白质生物信息学分析及系统进化树构建

使用 DNAMAN 软件查找基因的开放阅读框;使用在线软件 ExPASy-ProtParam Tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白理化性质;TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 软件预测蛋白质是否跨膜;SignalP-4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 预测蛋白质信号肽;Simple Modular Architecture Research Tool (<http://smart.embl-heidelberg.de/smart>) 预测蛋白质结构域特征;NetNGlyc 1.0 (<https://services>).

healthtech.dtu.dk/)预测糖基化位点; DNAMAN 软件进行氨基酸序列比对分析; 利用 MEGA 7.0 和 Clustal 2.1 软件, 采用邻接法(Neighbor-Joining method, NJ)构建系统进化树, Bootstrap (1000 次)得出各分支置信度。

1.4 基因表达特征分析

利用已经获得的 GH 基因全长 cDNA 序列的保守区域设计荧光定量检测引物(表 2)。以梭鲈 GAPDH 基因作为内参基因, 各组织样本 cDNA

为模板, 使用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNase H Plus)试剂盒(TaKaRa, 日本), ABI 7500 荧光定量 PCR 仪, 检测梭鲈 GH 基因在不同组织和极大极小组中各组织的相对表达模式, 每个样品设计 3 个重复。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量方法计算基因的相对表达量, 数据分析采用 SPSS 22.0 软件中单因素方差分析(one-way ANOVA)方法, 差异显著时进行 Duncan's 多重比较, 差异显著性以 0.05 为标准。

表 2 引物序列
Tab. 2 Primer sequence in this study

序列名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	产物长度/bp product length	退火温度/°C annealing temperature	用途 usage	扩增效率/% amplification efficiency
GH	F: GAGTTCAGCACCTCCACCTG R: CTCCAGAGGCTAACTGCACC	512	60	CDS 区扩增	—
5'-GH-GSP	CGCAGTGACTCGTCGGCGCTCAGAC	580	68	5'RACE 扩增	—
5'-GH-NGSP	CGCCGTCCTCGCTGGCCTTGATGAGC	495	70		
3'-GH-GSP	GGAATCCTGCTGCTCATCAAGGCCAGCG	468	68	3'RACE 扩增	—
3'-GH-NGSP	CGCCGACGAGTCACTGCGCAGAAC	364	70		
RT-GH-F	GCTCTGTGTTGAAGCTGTTGTC	99	60	定量 quantity	99.8
RT-GH-R	ATCTGGTTTCTGGGAGCTGAAC				
GAPDH-F	ATGTTTCGTCATGGGCGTCAA	135	60	内参引物 internal primer	99.8
GAPDH-R	CAGGCCCTCAATGATGACGA				

2 结果与分析

2.1 GH 基因的克隆和序列分析

克隆获得的梭鲈 GH 基因 cDNA 全长为 926 bp (GenBank 登录号: MT981414.2), 开放阅读框为 615 bp, 编码 204 个氨基酸, 5'端非编码区序列(untranslated region, 5'-UTR)为 74 bp, 3'端非编码区序列(untranslated region, 3'-UTR)为 237 bp, 带有典型的多腺苷酸化信号序列(AATAA)和多聚 poly (A)尾巴(图 1); 推导的 GH 蛋白分子式为 $C_{1025}H_{1642}N_{276}O_{312}S_6$, 相对分子量 23.02 kD, 理论 PI 值为 6.43, 蛋白质的不稳定系数为 58.99, 脂肪系数为 100.88, 亲水性平均系数为-0.186; 该蛋白无跨膜结构, 为胞外分泌蛋白; GH 氨基酸序列 N 端含有 1 个 17 个氨基酸组成的信号肽序列(1~17 aa)和一个 187 个氨基酸组成的成熟肽(18~204 aa), 还含有 1 个 Hormone_1 结构域(7~202 aa),

该结构域是受体活性位点(图 2); GH 蛋白存在 1 个 N-糖基化位点和 4 个保守的半胱氨酸残基(Cys⁶⁹, Cys¹⁷⁷, Cys¹⁹⁴, Cys²⁰²)。

2.2 GH 氨基酸序列比对及系统进化树分析

将 GH 氨基酸序列同其他物种进行多序列比对(图 3), 结果显示, 梭鲈与黄金鲈(*Perca flavescens*)和尖吻鲈(*Lates calcarifer*)氨基酸序列同源性最高, 相似性分别为 97.04%、94.05%, 而梭鲈与哺乳类相似性低于 40%。鱼类和哺乳类都含有 4 个保守的半胱氨酸残基(Cys⁶⁹, Cys¹⁷⁷, Cys¹⁹⁴, Cys²⁰²), 靠分子间的二硫键形成二聚体维持蛋白质的三级结构。系统发育树结果显示(图 4), 鱼类聚为一大支, 其中同为鲈科鱼类的梭鲈、黄金鲈、河鲈(*Perca fluviatilis*)聚为一小支, 亲缘关系最近, 鲈形目、鲤形目(Cypriniformes)和鲑形目(Salmoniformes)各聚为一支; 人和小鼠等哺乳动物则聚为另一大支, 亲缘关系较远。

```

1   ATGGGGAGAAAAGCTGAACCACCTGAACTCAGATCAGATCAACCAGAACTCAACCAGAACTC
61  AACCAGAACCAGCCATGGAAAGAGCCGTCCTCCTGCTGCTCGCTGCTGCTTTGGGCGTGT
1   M E R A V L L L S L L S L G V
121 CCTCTCAGCCAATCACAGACGGCCAGCGTCTGTTCTCCATCGCCGTCAGCAGAGTTTCAGC
16  S S Q P I T D G Q R L F S I A V S R V Q
181 ACCTCCACCTGCTTGCTCAGAGACTCTTCTCCGACTTTGAGAGCTCTCTGCAGACGGAGG
36  H L H L L A Q R L F S D F E S S L Q T E
241 AGCAGCGTCAACTCAACAAAATCTTCTGCAGGATTTCTGCAACTCTGATTACATCATCA
56  E Q R Q L N K I F L Q D F C N S D Y I I
301 GCCCCATCGACAAACACGAGACACAACGCAGCTCTGTGTTGAAGCTGTGTCTATTTCTT
76  S P I D K H E T Q R S S V L K L L S I S
361 ATCGTTTGGTCGAGTCCTGGGAGTTTCCGAGTCGTTCTCTATCTGGAGGTTTCAGCTCCCA
96  Y R L V E S W E F P S R S L S G G S A P
421 GAAACCAGATTTCCCCAAACTGTCGGAAGTGAAGACAGGAATCCTGCTGCTCATCAAGG
116 R N Q I S P K L S E L K T G I L L L I K
481 CCAGCGAGGACGGCGCCGAGCTTTTCCCCGACAGCTCAGCTCTGCAGCTGCCACCGTATG
136 A S E D G A E L F P D S S A L Q L P P Y
541 GAAACTATTACCAAAGTCTGAGCGCCGACGAGTCACTGCGCAGAACCCTACGAAGTGTGG
156 G N Y Y Q S L S A D E S L R R T Y E L L
601 CCTGCTTCAAGAAAGACATGCACAAGGTGGAGACGTACCTGACAGTGGCGAAATGTCGAC
176 A C F K K D M H K V E T Y L T V A K C R
661 TCTCTCCAGAAGCTAACTGCACCTGTAGCCCCGCCCTCCACCCTCTGGCAGGTAGGCC
196 L S P E A N C T I *
721 CACCCCGTAGAAGATGTCACATCCTGTGTGCTCTGTAGCCAGCCTCCATGTTATCTGT
781 CTCCGCTAACTAGGGTTAGCATTAGCTTTAGTGTCTTTGCTGATGATGAAATGTTTTC
841 TGATGAGAACAGGAAGTGATGTCATACTGTGACGCTGTGAATAAAGCTGTGTTGCATTC
901 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 梭鲈 GH 基因 cDNA 序列及其推导氨基酸序列

黑下划线表示梭鲈 GH 前体蛋白的信号肽为前 17 个氨基，成熟肽为第 18~204 个氨基酸，方框表示 4 个保守的半胱氨酸残基，蓝色阴影为 N-糖基化位点，黄色阴影表示加尾信号，“*”表示终止密码子。

Fig. 1 cDNA sequence of *Sander lucioperca* GH gene and deduced amino acid sequence

The signal peptide of GH precursor is 17 amino acids and is marked by black line; mature peptide is number 18–204 amino acids; Hormone_1 domain is number 18–204 amino acids, and the four conserved cysteine residues are annotated respectively by a square; putative N-glycosylation sites are annotated respectively by a blue circle. The yellow shadow indicates tailing signal; “*” indicates the stop codon.

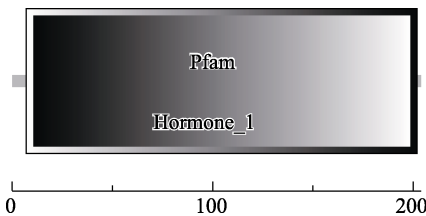


图 2 梭鲈 GH 基因结构域特征

Fig. 2 Characterization of GH gene domain in *Sander lucioperca*

2.3 GH 基因组 DNA 序列结构分析

根据 NCBI 数据库梭鲈 GH 基因组序列可知，GH 基因组 DNA 全长 2875 bp (GenBank 登录号：116063544)。通过比较研究斑马鱼(*Danio rerio*)、小鼠(*Mus musculus*)和人(*Homo sapiens*)的基因组 DNA 结构，结合已克隆获得的 GH 基因 CDS 区序列，发现梭鲈 GH 基因组包含 6 个外显子和 5 个内含子，而斑马鱼、人和小鼠有 5 个外显子和 4

个内含子。斑马鱼、小鼠和人的 GH 基因组长度分别是梭鲈的 1.8 倍、1.2 倍和 0.5 倍(图 5)。梭鲈 GH 基因外显子长度分别 10 bp、134 bp、117 bp、144 bp、147 bp、63 bp，内含子分别为 150 bp、556 bp、660 bp、200 bp、394 bp。

2.4 GH 基因在不同组织中表达特征分析

采用实时荧光定量 PCR 技术检测了 GH 基因在梭鲈 10 个组织中的表达情况(图 6)。结果显示，该基因在所有检测组织中均有表达，但存在组织差异性。10 个组织中基因相对表达量从高到低依次是垂体、脑、脾、鳃、胃、皮肤、心、肌肉、肠和肝，以心脏组织中 GH 表达水平为对照，垂体中 GH 表达量是心的 64 倍，垂体和脑的表达量相对高于其他组织且差异极显著($P < 0.01$)，同时垂体和脑之间的表达量差异极显著($P < 0.01$)，脾、鳃、胃等其他组织之间相对表达量差异不显著。

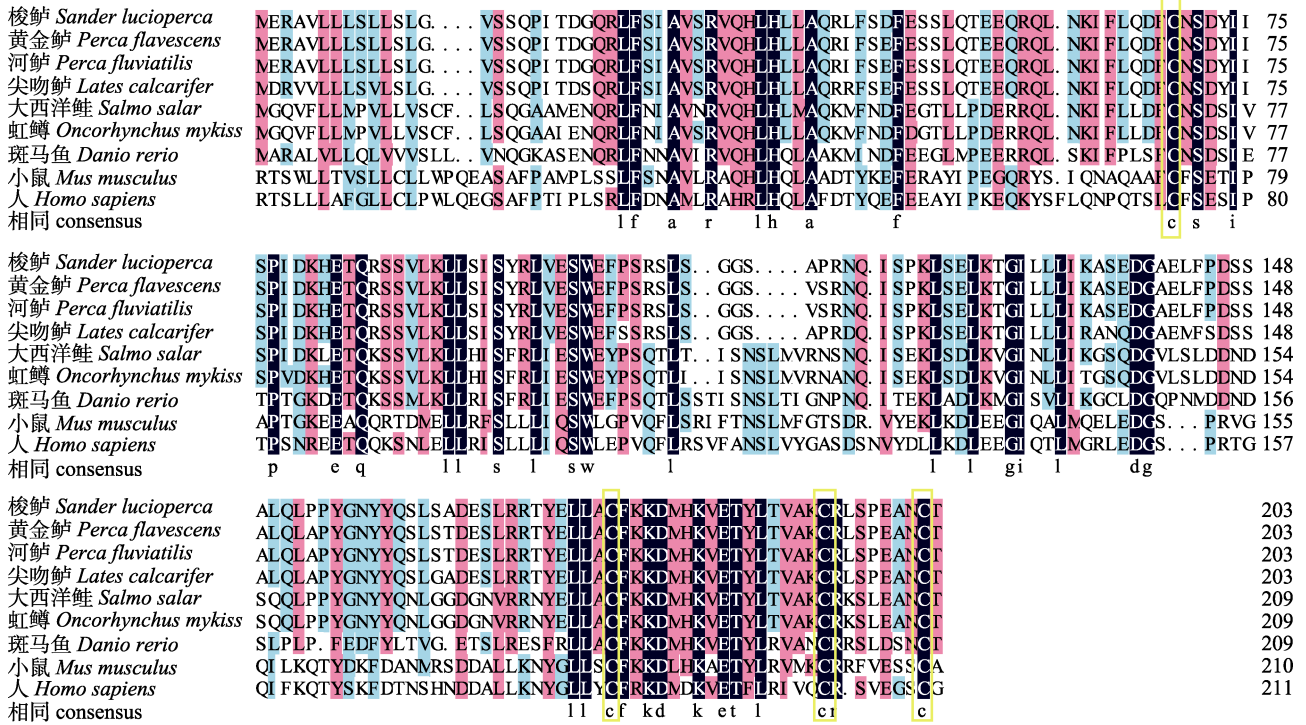


图 3 梭鲈 GH 与其他物种氨基酸序列的同源性多重比较

序列中相同氨基酸残基用黑色背景表示, 相似性超过 75% 用粉红色背景表示, 相似性超过 50% 用浅蓝色背景表示, 矩形框表示 4 个保守的半胱氨酸残基。

Fig. 3 Multiple alignment of deduced amino acid sequences of *Sander lucioperca* GH with the corresponding sequence from other species

Position with > 50% similarity is shaded in blue; position with > 75% similarity are shaded in pink, while completely conserved positions are shaded in black; four conserved cysteine residues are boxed.

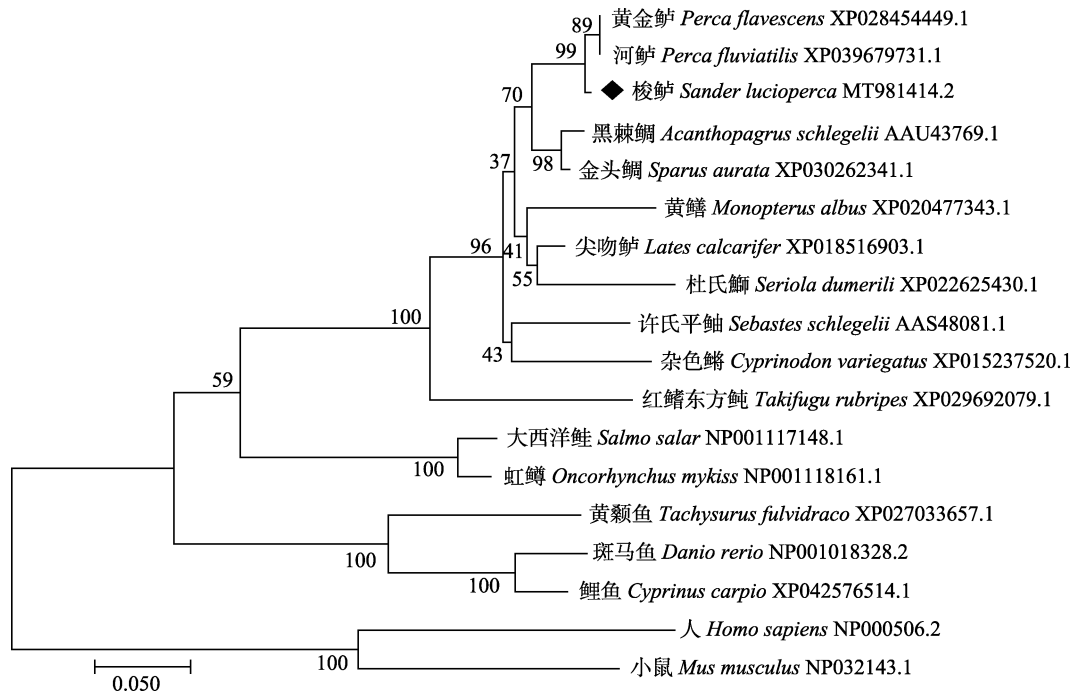


图 4 不同物种间 GH 蛋白序列 N-J 系统进化树

Fig. 4 N-J phylogenetic tree of GH protein sequence in different species

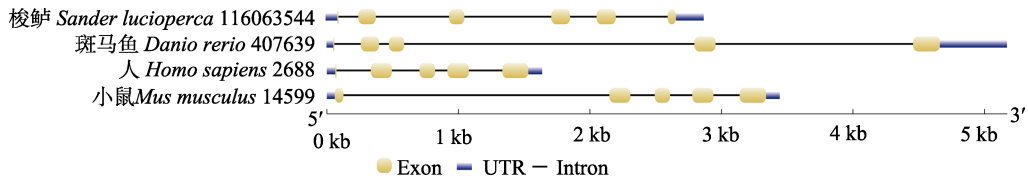


图 5 GH 基因组结构分析

Fig. 5 Genomic organization of GH

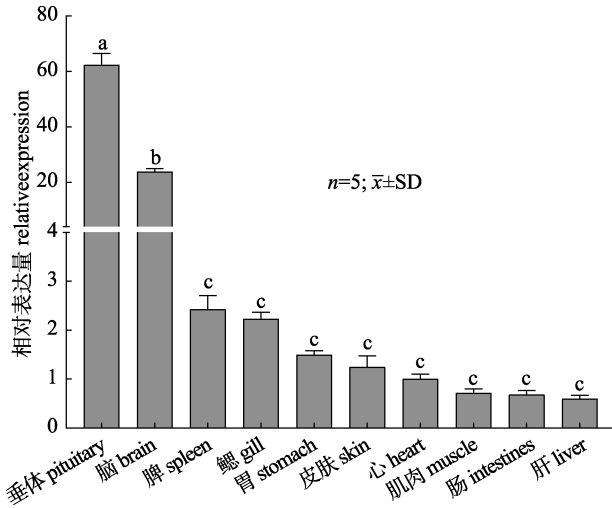


图 6 GH 基因在梭鲈各组织的表达特征

不同小写字母代表不同组织的差异极显著 ($P < 0.01$), 相同字母代表不同组织之间差异不显著 ($P > 0.05$). 心为参考样本.

Fig. 6 The expression of GH in different tissues of *Sander lucioperca*

Different lowercase letters indicate the very significant differences between different tissues ($P < 0.01$); the same letter indicate no significant differences between different tissues. Heart is reference sample.

2.5 GH 基因在生长差异个体间表达分析

通过实时荧光定量 PCR 技术分析了 GH 基因在梭鲈生长极端差异两组间脑、垂体、肝和肌肉组织中表达水平(图 7)。结果显示, 4 个组织中 GH 基因表达量均为极大组高于极小组, 其中垂体和脑组织中差异呈极显著水平 ($P < 0.01$), 差异表达倍数分别为 12.3、14.1 倍, 肌肉组织中差异呈显著水平 ($P < 0.05$), 差异表达倍数为 3 倍, 但在肝组织中差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 GH 基因序列特征的生物信息学分析

本研究中梭鲈 GH 基因存在四个保守的半胱氨酸残基和两个二硫键, 多序列比对结果显示, 梭鲈同其他硬骨鱼类一样都存在四个保守的半胱

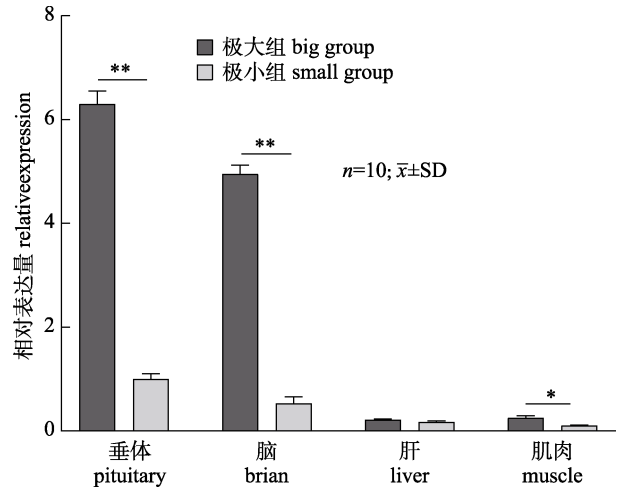


图 7 GH 基因在梭鲈极端大小个体差异的表达分析

**表示极显著性差异 ($P < 0.01$); *表示显著性差异 ($P < 0.05$), 极小组垂体为参考样本.

Fig. 7 The different expression level of GH in big and small of *Sander lucioperca*

** indicates the very significant difference ($P < 0.01$); * indicates significant difference ($P < 0.05$); the pituitary of the small group is reference sample.

氨酸残基, 且近 C-端区域内的序列高度保守, 这对生长激素与受体结合发挥生物学作用及维持蛋白质结构起着重要作用。梭鲈 GH 蛋白质 C 端只存在一个 N-糖基化位点 Asn-Cys-Thr, 和鲈形目的银鲈^[9]、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[15]的糖基化位点数目一致, 但鲤形目的赤眼鳟^[10]存在两个糖基化位点, 可能是物种间的进化过程差异导致 N-糖基化位点个数不同, 还有待进一步研究。多重氨基酸序列比对和系统进化树分析显示, 梭鲈 GH 的氨基酸序列在进化上与同为鲈科鱼类的黄金鲈、河鲈最为接近, 与其他物种亲缘关系远, 鲤形目、鲑形目、哺乳动物各聚为一支, 这与传统形态学分类较为一致, 说明该基因在进化的过程中较为保守, 该系统进化树较真实地反映了该物种进化的关系。

基因结构比较分析发现, 梭鲈 GH 基因有 6

个外显子和 5 个内含子, 这与斜带石斑鱼^[15]、翘嘴鲮(*Siniperca scherzeri*)^[16]等鲈形目鱼类外显子和内含子数目一致。斑马鱼、人和小鼠 GH 基因有 5 个外显子, 赤眼鲮^[10]、斑鳢(*Channa maculata*)^[17]、河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)^[18]等鱼类也含有 5 个外显子, 这与梭鲈外显子数目不一致, 主要是第 5 外显子和第 6 外显子之间插入一个内含子造成的, 说明 GH 基因结构在不同的物种中存在相似性和特异性, 可能与物种间进化速率不同有关。同时, 也发现不同物种间 GH 基因长度差异主要是内含子长度差异引起的, 说明外显子相对内含子来说比较保守。

3.2 GH 基因在不同组织中的表达分析

GH 基因在组织中的分布已在鲤形目^[10]、鲈形目^[19]、鲇形目(*Siluriformes*)^[20]、鲽形目(*Pleuronectiformes*)^[21]等鱼类中得到广泛的研究。本研究中, GH 在检测的 10 个组织中均有表达, 其中垂体中相对表达水平最高, 这也意味着 GH 作为生长轴上的关键基因对鱼体的各个器官组织发挥重要的调控作用。在少数鱼类中, GH 基因仅在垂体中表达, 如赤眼鲮^[10]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[19]的脑、肝、肌肉、肠、脾、心、鳃、肾、皮肤组织中均未检测到表达。Deng 等^[22]在具有雌雄生长差异特性的金钱鱼(*Scatophagus argus*)中研究发现, 生长快速的 30 月龄雌鱼垂体 GH 基因表达量是雄鱼的 6.34 倍。说明垂体是 GH 合成和分泌的关键部位, GH 在鱼类个体生长过程中发挥关键作用且在不同物种间存在组织表达差异性。类似的, GH 基因在梭鲈脑、肝、脾、鳃、心、胃、肠、皮肤等组织均有表达, 但具有组织表达差异性, 通常在垂体中表达量最高, 这与瓦氏黄颡鱼^[20]、大刺鲃^[23]结论一致, 但大刺鲃^[23]脾和鳃中 GH 基因表达量较低, 而本研究梭鲈脾和鳃中表达量较高, 这说明垂体外的 GH 可能以自分泌或旁分泌的形式作用于自身或相邻细胞发挥多种生物学功能, 其中, GH 可能通过免疫和渗透压调节过程增强梭鲈对环境的适应能力进而促进自身生长, 但还需进一步研究。瓦氏黄颡鱼^[20]GH 表达量除垂体和脑以外在肌肉中表达量较高, 说明

GH 也参与肌肉的生长调节, 但在本研究中梭鲈肌肉的表达量较低, 可能是一龄梭鲈此时正处于快速生长时期, 垂体中 GH 的合成和分泌非常旺盛, GH 直接通过 GH/IGF 轴刺激肝脏合成 IGFs 促进各组织细胞的生长分化, 减弱了肌肉中 GH 的表达。

3.3 GH 基因在生长差异个体间表达分析

鱼类在生长发育过程中存在个体大小和生长速度的差异, 除了温度、养殖密度、饵料种类等外界因素的影响之外, 其生长轴上的基因表达水平也决定了鱼类生长的快慢。鱼类 GH 基因在垂体组织的转录水平反映了 GH 基因 mRNA 合成速度, 是鱼类生长速度的有效指标之一^[19]。Figueroa 等^[7]发现鲤鱼(*Cyprinus carpio*)在生长快速季节垂体 GH 基因表达水平显著高于生长慢速季节($P < 0.01$), Zhong 等^[24]研究表明生长快速的尼罗罗非鱼雄鱼垂体中 GH 基因表达水平显著高于雌鱼($P < 0.05$), 林明德等^[25]研究发现生长快速的褐点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*) F₁ 子代脑中表达水平高于生长慢的亲本。这些与本研究中 GH 基因在梭鲈极大组垂体和脑中表达量极显著高于极小组($P < 0.01$)的结果相一致, 反映出 GH 可能通过调控神经系统的生长发育及组织分化来影响梭鲈的生长。

肝脏是 GH 发挥生理作用的主要靶器官, GH 通过与肝细胞膜表面生长激素受体 GHR 结合诱导 IGFs 生成进而促进动物的生长。Ma 等^[21]研究表明生长快速的半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)雌鱼和极大雄鱼肝中 GH 基因表达水平显著高于雄鱼($P < 0.05$), Ma 等^[26]研究发现生长快速的黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)雄鱼肝中 GH 基因表达水平高于生长慢的雌鱼, 这与本研究中 GH 基因在梭鲈极大组肝中表达量高于极小组的结果一致。推测肝脏中 GH 基因的表达水平差异可能影响 GH 与肝脏表面受体 GHR 的结合, 从而影响梭鲈的生长速度。

肌肉占体重的 50%~70%, 鱼类的生长主要依赖肌肉质量的增加, GH 可刺激肌肉组织中蛋白质的合成代谢和细胞增殖分化从而加快鱼类生长速

度^[22]。刘加林等^[27]研究发现太湖鲂鮨(*Culter alburnus*♀×*Megalobrama terminalis*♂)F₂极大组肌肉中 GH 基因表达量是极小组的 4.6 倍,臧坤等^[28]研究表明生长快速的星突江鲢(*Platichthys stellatus*)雌鱼肌肉中 GH 基因表达量显著高于生长慢的雄鱼($P<0.05$),傅建军等^[29]研究显示青灰色组鲤的体重、体高、体长等生长性状极显著或显著高于橘红色组,其肌肉中 GH 基因表达量极显著高于橘红色组($P<0.01$),本研究也得到了相同结论, GH 基因在梭鲈极大组肌肉中表达量显著高于极小组($P<0.05$)。已有证据也表明, GH 可直接与肌肉等器官上的受体结合而影响细胞营养物质的合成代谢与生长发育^[30]。总的来说, GH 基因在梭鲈体重极大组生长相关组织表达水平高于极小组,充分说明了 GH 基因的表达量与鱼类的生长呈正相关关系, GH 对鱼类的生长速度具有促进作用。因此, GH 基因可作为梭鲈生长发育的标记基因并用于生长性状的分子选育。

参考文献:

- [1] Li W S, Lin H R. The endocrine regulation network of growth hormone synthesis and secretion in fish: Emphasis on the signal integration in somatotropes[J]. *Science China Life Sciences*, 2010, 53(4): 462-470.
- [2] Zhang Y X, Wang B, Liu X Z, et al. Physiological role of the growth axis in embryonic development and early growth of *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(2): 287-295. [张雅星, 王滨, 柳学周, 等. 生长轴对半滑舌鳎早期生长发育的调控作用[J]. *中国水产科学*, 2019, 26(2): 287-295.]
- [3] Véléz E J, Perelló M, Azizi S, et al. Recombinant bovine growth hormone (rBGH) enhances somatic growth by regulating the GH-IGF axis in fingerlings of gilthead sea bream (*Sparus aurata*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2018, 257: 192-202.
- [4] Xie S M, Wang Y Y, Nie Z J, et al. Effects of feeding frequency on the growth, physiology and expression abundance of IGF-1 and GH mRNA in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) reared in in-pond raceway culture systems[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(4): 363-374. [谢苏明, 王裕玉, 聂志娟, 等. 投喂频率对池塘工程化循环水养殖大口黑鲈生长、生理及肝脏 GH、IGF-I 基因表达丰度的影响[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(4): 363-374.]
- [5] Degani G, Tzchori I, Yom-Din S, et al. Growth differences and growth hormone expression in male and female European eels (*Anguilla anguilla*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 134(1): 88-93.
- [6] Lynn S G, Wallat G K, Malison J A, et al. Developmental expression and estrogen responses of endocrine genes in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 171(2): 151-159.
- [7] Figueroa J, Martín R S, Flores C, et al. Seasonal modulation of growth hormone mRNA and protein levels in carp pituitary: evidence for two expressed genes[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2005, 175(3): 185-192.
- [8] Shahjahan M, Zahangir M M, Islam S M M, et al. Higher acclimation temperature affects growth of rohu (*Labeo rohita*) through suppression of GH and IGFs genes expression actuating stress response[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2021, 100(2): 103032.
- [9] Xiao J Z, Qiao Q T, Jia Z Y, et al. Cloning and differential expression of the growth hormone in *Pampus argenteus*[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2018, 34(4): 954-963.
- [10] Wang J A, Li D, Zhao X, et al. GH and GHR gene cloning, expression and their associations with growth-related traits of the barbel chub (*Squaliobarbus curriculus*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2020, 243-244(10): 110429.
- [11] Sun Z P, Cao D C, Pei Y, et al. Analysis and evaluation of nutritional composition in muscle of wild and farmed pikeperch *Sander lucioperca*[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2020, 33(4): 15-22. [孙志鹏, 曹顶臣, 裴玥, 等. 野生和养殖梭鲈肌肉营养成分分析与评价[J]. *水产学杂志*, 2020, 33(4): 15-22.]
- [12] Wang T, Shen Y, Sun L S, et al. Comparison of muscle quality among Pikeperch, Largemouth bass and Mandarin fish[J]. *Journal of Aquaculture*, 2020, 41(7): 17-23. [汪涛, 沈勇, 孙龙生, 等. 梭鲈与加州鲈、鳊鱼的肌肉品质比较[J]. *水产养殖*, 2020, 41(7): 17-23.]
- [13] Han X F. Development of SSR markers, GHR gene cloning and expression of *Sander lucioperca*[D]. Suzhou: Soochow University, 2016. [韩晓飞. 白梭吻鲈微卫星分子标记开发及 GHR 基因的克隆表达分析[D]. 苏州: 苏州大学, 2016.]
- [14] Teng T, Zhao X, Li C, et al. Cloning and expression of IGF-I, IGF-II, and GHR genes and the role of their single-nucleotide polymorphisms in the growth of pikeperch (*Sander lucioperca*)[J]. *Aquaculture International*, 2020, 28(4): 1547-1561.
- [15] Li W S, Chen D, Wong A O, et al. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 144(1): 78-

- 89.
- [16] Lu S Q, Liu F, Liu Z, et al. Comparison in cloning and sequence of growth hormone gene in three species of genus *Siniperca*[J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2008, 39(4): 354-361. [鲁双庆, 刘峰, 刘臻, 等. 三种鳊鱼(*Siniperca*)生长激素基因的克隆及序列比较[J]. *海洋与湖沼*, 2008, 39(4): 354-361.]
- [17] Gao D D, Ou M, Wu Y D, et al. Gene cloning and expression analysis of growth hormone gene from blotched snakehead (*Channa maculata*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2021, 29(12): 2328-2341. [高丹丹, 欧密, 吴燕铎, 等. 斑鳢生长激素基因的克隆及表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2021, 29(12): 2328-2341.]
- [18] Liu J L, Liu S L, Jiang W P, et al. Cloning and bioinformatics analysis of GH gene and its flanking region in *Odontobutis potamophila*[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2019, 31(9): 1461-1470. [刘加林, 刘士力, 蒋文枰, 等. 河川沙塘鳢 GH 基因及侧翼的克隆与生物信息学分析[J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(9): 1461-1470.]
- [19] Ma X L, Zhang Y, Hang W R, et al. cDNA cloning of growth hormone, growth hormone receptor and the different expression between male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2006, 55(5): 924-933. [马细兰, 张勇, 黄卫人, 等. 尼罗罗非鱼生长激素及其受体的 cDNA 克隆与 mRNA 表达的雌雄差异[J]. *动物学报*, 2006, 52(5): 924-933.]
- [20] Xu M H, Long M H, Wang Y R, et al. Cloning and differential expression of growth hormone in *Pelteobagrus vachelli*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(5): 652-662. [徐敏华, 龙丽娜, 王悦如, 等. 瓦氏黄颡鱼生长激素基因克隆及其组织特异性表达分析[J]. *水产学报*, 2012, 36(5): 652-662.]
- [21] Ma Q, Liu S, Zhuang Z, et al. Genomic structure, polymorphism and expression analysis of the growth hormone (GH) gene in female and male Half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Gene*, 2012, 493(1): 92-104.
- [22] Deng S P, Wu B, Zhu C H, et al. Molecular cloning and dimorphic expression of growth hormone (*gh*) in female and male spotted scat *Scatophagus argus*[J]. *Fisheries Science*, 2014, 80(4): 715-723.
- [23] Zong D M, Huang D M, He P Y, et al. Cloning and expression analysis of growth hormone gene in *Mastacembelus armatus*[J]. *Guangxi Agricultural Sciences*, 2020, 51(1): 194-201. [钟东明, 黄小琪, 何佩莹, 等. 大刺鲃生长激素基因克隆与表达分析[J]. *南方农业学报*, 2020, 51(1): 194-201.]
- [24] Zhong H, Xiao J, Chen W, et al. DNA methylation of pituitary growth hormone is involved in male growth superiority of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 171: 42-48.
- [25] Lin M D, Chen G, Ma J, et al. Differentially expression genes analysis of hybrid grouper and female tiger grouper based on transcriptome sequencing[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2019, 39(3): 15-23. [林明德, 陈刚, 马骞, 等. 杂交石斑鱼和母本褐点石斑鱼转录组测序及差异表达基因分析[J]. *广东海洋大学学报*, 2019, 39(3): 15-23.]
- [26] Ma W G, Wu J J, Zhang J, et al. Sex differences in the expression of GH/IGF axis genes underlie sexual size dimorphism in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Science China Life Sciences*, 2016, 59(4): 431-433.
- [27] Liu J L, Jia Y Y, Liu S L, et al. Structure, phylogeny and tissue distribution of GH in *Culteralburnus*♀×*Megalobrama terminalis*♂[J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2020, 51(6): 1440-1451. [刘加林, 贾永义, 刘士力, 等. 太湖鲂 F₂ 代 GH 基因结构、系统发育和表达特征[J]. *海洋与湖沼*, 2020, 51(6): 1440-1451.]
- [28] Zang K, Liu X Z, Xu Y J, et al. Molecular cloning and in vitro expression of growth hormone gene from *Platichthys stellatus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1230-1242. [臧坤, 柳学周, 徐永江, 等. 星突江鳊生长激素基因的克隆及体外重组表达分析[J]. *水产学报*, 2014, 38(9): 1230-1242.]
- [29] Fu J J, Zhu W B, Luo W T, et al. Comparison of growth, tyrosinase activity, melanin content, and gene expression between common carps with different pigmentations[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(8): 939-947. [傅建军, 朱文彬, 罗文韬, 等. 不同体色鲤的生长、酪氨酸酶活性、黑色素含量及基因表达比较[J]. *中国水产科学*, 2021, 28(8): 939-947.]
- [30] Dunshea F R, Harris D M, Bauman D E, et al. Effect of porcine somatotropin on in vivo glucose kinetics and lipogenesis in growing pigs[J]. *Journal of Animal Science*, 1992, 70(1): 141-151.

Sequence characteristics of GH gene in *Sander lucioperca* and relationship between its expression and growth differences among individuals

ZHOU Jia^{1,2}, SUN Zhipeng¹, LV Weihua¹, CAO Dingchen¹, LU Cuiyun^{1,2}, LIU Tianqi¹, JI Yudan^{1,2}, ZHENG Xianhu^{1,2}

1. National and Local Joint Engineering Laboratory for Freshwater Fish Breeding; Key Laboratory of Freshwater Aquatic Biotechnology and Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China
2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Germplasm Resources, Ministry of Agriculture and Rural Areas; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: This paper aims to clone the growth hormone (GH) gene of *Sander lucioperca* and explore its sequence characteristics and the relationship between its expression and growth traits to provide a theoretical basis for the study of its molecular mechanism in relation to growth. The GH gene was cloned from the pituitary of *Sander lucioperca* using RACE technology. The full-length of cDNA was 926 bp, including a 74-bp 5' untranslated region, a 237-bp 3' untranslated region, and an open reading frame encoding 204 amino acids. Amino acid multiple alignment and phylogenetic tree analysis indicated that the similarity between the GH gene of *Sander lucioperca* and that of *Perca flavescens* (97.04%) and *Perca fluviatilis* (94.05%) was the highest. The GH gene had four conserved cysteine residues in fish and mammals. GH gene expression in different tissues and individuals of extreme body masses was analyzed using real-time fluorescence quantitative PCR technology. The results showed that the GH gene was expressed in all tissues of *Sander lucioperca*, with the highest relative levels of expression in the pituitary, followed by the brain; the relative expression in these two tissues was significantly different from that in other tissues ($P < 0.01$). GH gene expression was also found to be positively correlated with body mass in *Sander lucioperca*. In *Sander lucioperca* individuals with an extreme body mass, GH gene expression in the four aforementioned tissues was higher in the extremely large group than in the extremely small group; these differences were extremely significant in the pituitary ($P < 0.01$) and significantly different in the muscle ($P < 0.05$). These results indicate that the GH gene can be used as a molecular marker for growth in *Sander lucioperca*. This study provides insights into the function of the GH gene and the molecular mechanism underlying gene regulation in the growth and development of *Sander lucioperca*.

Key words: *Sander lucioperca*; GH gene; sequence characteristics; growth; expression differences

Corresponding author: ZHENG Xianhu. E-mail: zhengxianhu@hrfri.ac.cn