

唐鱼生长激素基因的克隆及序列分析

郁二蒙^{1,2}, 叶星^{1c}, 白俊杰¹, 简清¹, 劳海华¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380; 2. 上海水产大学生命科学技术学院, 上海 200090)

摘要 [目的] 为开展唐鱼转自源基因研究提供基本构架。[方法] 采用 RT-PCR 和 RACE 技术分离唐鱼生长激素基因(GH)全长 cDNA 序列, 同时利用 PCR 克隆了唐鱼生长激素基因的基因组(gDNA)序列。[结果] 序列分析表明: 唐鱼 GH cDNA 的 5 非编码区为 64 bp, 3 非编码区为 448 bp, 开放阅读框(ORF)633 bp, 共编码 210 个氨基酸, 包括 22 个氨基酸的信号肽和 188 个氨基酸的成熟肽。应用 MEGA 3.1 软件进行序列同源性比较分析的结果显示, 唐鱼 GH cDNA 所编码的氨基酸序列与近缘鱼种(草鱼、青鱼、鳊鱼、鲤鱼、斑马鱼等)的生长激素氨基酸序列有很高的同源性, 其中与草鱼和鳊鱼的同源性高达 98%。该研究获得的唐鱼生长激素基因的 gDNA 序列共有 1403 bp, 包括 4 个外显子和 3 个内含子, 外显子大小分别 150、117、162、204 bp; 3 个内含子都以 GT 开头、AG 结尾, 符合 GT-AG 法则。[结论] 该研究为下一步构建自源 GH 基因构件, 进行唐鱼的转自源 GH 基因研究, 培育出生长快、体型大的唐鱼新品系奠定了基础。

关键词 唐鱼; 生长激素; cDNA; 克隆; 序列分析

中图分类号 S965.199 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)23-09914-04

Cloning and Sequence Analysis of Growth Hormone Gene from *Tanichthys albonubes*

YU Er-meng et al (Pearl River Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong 510380)

Abstract [Objective] The research aimed to provide the basic structure for the study of self transgene of *Tanichthys albonubes*. [Method] The full length cDNA encoding *T. albonubes* growth hormone (TcGH) was cloned with RT-PCR and RACE (rapid amplification of cDNA ends). [Result] The TcGH cDNA consisted of an open reading frame of 633 bp, 5' and 3' untranslated regions of 64 and 448 bp respectively. The deduced amino-acid sequence of the TcGH had 210aa, including a putative signal peptide (22aa) located at its N-terminal. The homology of the TcGH amino-acid with relative species (grass carp, black carp, bighead carp, carp, zebra fish, etc.) was high, and was as much as 98% with grass carp and bighead carp. The genomic DNA (gDNA) of *T. albonubes* growth hormone was obtained by PCR. The gDNA sequence consisted of four exons (150, 117, 162 and 204 bp in length, respectively) and three introns. This three introns started with GT and ended with AG, in accordance with GT-AG principle. According to amino acid of growth hormone, the molecular phylogenesis tree of 25 species of fishes belonging to nine families was established to analyze their homogeneity and evolution, and the results were similar to those analyzed by traditional morphology and biochemistry in their evolution status. [Conclusion] This research provided the foundation for construction of GH gene elements, the study of self transgene of *T. albonubes* and the new lines breeding of rapid growth, big *T. albonubes*.

Key words *Tanichthys albonubes*; Growth hormone; cDNA; Cloning; Sequence analysis

唐鱼 (*Tanichthys albonubes*) 又名白云金丝鱼 (White Cloud Mountain Minnow), 隶属鲤形目鲤科唐鱼属, 为我国特有种。目前很多学者对于唐鱼的繁殖习性、核型以及起源等方面进行了研究^[1-4], 但分子生物学方面的研究较少, 关于唐鱼生长激素基因的分离研究还未见报道。

鱼类生长激素 (Fish Growth Hormone, fGH) 是由鱼类脑垂体合成和分泌的一种蛋白多肽, fGH 对鱼类的免疫系统、生殖生理及海水适应性也有着重要的影响^[5]。目前国内外学者对鱼类 GH 的结构和功能进行了详细的研究。该研究分离了唐鱼 GH, 并进行 GH 编码氨基酸序列的同源性比较分析, 为开展唐鱼转自源基因研究提供基本构架, 以期获得快速生长或体型大的唐鱼新品系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料。 试验用唐鱼由中国水产科学研究院珠江水产研究所培育。大肠杆菌 DH₅α 由中国水产科学研究院珠江水产研究所实验室保存。

1.1.2 试剂。 DNA 提取试剂盒 (E. Z. N. A SQ Tissue DNA Kit)、质粒 DNA 提取试剂盒 (E. Z. N. A Plasmid Miniprep Kit) 和胶回收试剂盒 (E. Z. N. A Gel Extraction Kit) 为美国 Omega 公司 (广州奇特科生物工程有限公司) 产品。克隆用的载体

pMD19-T Vector Systems (T 载体)、限制性内切酶、RNA 酶 (RNase) 和 PCR 扩增试剂盒 (TaKaRa LA PCR Kit Ver2.1) 购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成。 参照 GenBank 中已登录的鲤科鱼类生长激素基因开放阅读框 (Open Reading Flame, ORF) 序列在同源保守区内设计引物, 上游引物为 GHSF, 下游引物为 GHSR, 以分离唐鱼 GH 基因 ORF 序列。

根据上述生长激素基因 ORF 序列设计了 1 对下游引物 (R1 和 R2) 以进行唐鱼生长激素基因 cDNA 的 5'RACE 扩增。上游引物使用 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 的通用引物 UPM 和 NUP。同时在生长激素基因 ORF 序列上设计了 1 条上游引物 (NP), 下游引物为 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 的通用引物 M13 Primer M4, 以克隆唐鱼生长激素基因 cDNA 的 3'端。引物序列见表 1。

表 1 克隆生长激素基因的引物

Table 1 Primers for cloning the GH gene

引物名称	序列(5'→3')
Primer name	Sequence(5'→3')
GHSF	ATGGCTAGAGCATTRGTCC
GHSR	CTACAGGCTGCAGTTTGAATCC
R1	CAATGAGCGGAAAGAGATG
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTG GTATCAACGCAGAGT
R2	GGTTGTCCTCAAAGTCGTTAATC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
NP	GTC AACCAACATGACGACAATGAC
M13 Primer M4	GTTTCCAGTCACGAC

基金项目 广东省科技计划项目(2005B20301018)。

作者简介 郁二蒙(1983-), 男, 安徽阜阳人, 硕士研究生, 研究方向: 水产动物遗传育种。*通讯作者, 研究员, E-mail: gzyexing@163.com。

收稿日期 2008-05-30

1.2.2 唐鱼 GH cDNA 的克隆。

1.2.2.1 唐鱼总 RNA 的提取。取出膜后 5 d 的唐鱼幼鱼 20 尾,提取总 RNA。具体步骤参照试剂盒 SV Total RNA Isolation System(Promega 公司)的操作说明。提取的 RNA 用浓度 0.8% 琼脂糖电泳检测, -20 °C 保存备用。

1.2.2.2 唐鱼 GH ORF 的克隆。以唐鱼总 RNA 为模板,反转录按 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0 试剂盒的步骤操作。以 GHSF 和 GHSR 为引物进行 PCR 扩增,反应条件为 94 °C 预变性 4 min 后进入循环:94 °C 变性 30 s,54 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1.0 min,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min,4 °C 保存。用浓度 1.0% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物,胶回收试剂盒(E. Z. N. A Gel Extraction Kit)回收。回收产物与 pMD19-T Vector 连接并转化大肠杆菌 DH₅α 菌株,经菌落 PCR、质粒酶切鉴定挑选出阳性克隆进行测序。测定结果通过 BLAST 软件搜索 National Center for Biotechnology Information(NCBI)的核酸数据库,进行同源性比较。

1.2.2.3 5'RACE 与 3'RACE 扩增。采用 BD 公司的 SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit,按照试剂盒的操作说明进行唐鱼生长激素基因 cDNA 5'RACE 扩增。用 R1 和 UMP 进行 5'RACE 扩增,PCR 扩增反应条件:先 94 °C 变性 3 min 后进入循环,每个循环包括 94 °C 变性 30 s,54 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环。最后一次循环结束时 72 °C 延伸 7 min。经浓度 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。以扩增产物为模板,以 R2 和 NUP 做半套式扩增后获得单一的特异条带。PCR 扩增反应条件:反应前先 94 °C 变性 3 min,每个循环包括 94 °C 变性 30 s,54 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环。PCR 扩增产物回收测序,具体操作同上。

反转录获得 cDNA 第一链后,用引物 NP 和 M13 Primer M4 进行 3'RACE 扩增。PCR 扩增反应条件同 5'RACE 扩增。PCR 扩增产物回收测序,具体操作同上。

最后用 Vector 软件将 5'和 3'端序列及 ORF 序列进行拼接即获得了唐鱼 β-actin 基因的 cDNA 全序列。测定结果通过 BLAST 软件搜索 NCBI 的核酸数据库,进行同源性比较。

1.2.3 唐鱼 GH gDNA 的克隆。取唐鱼肌肉组织 30 mg,提取基因组 DNA,具体操作参照 E. Z. N. A SQ Tissue DNA Kit 推荐的方法。提取的基因组 DNA 用浓度 0.8% 琼脂糖电泳检测, -20 °C 保存备用。

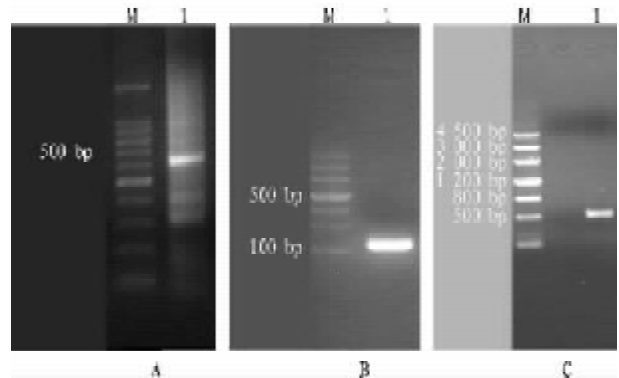
以唐鱼基因组 DNA 为模板,以 GHSF 和 GHSR 为引物进行 PCR 扩增,反应条件为 94 °C 预变性 4 min 后进入循环:94 °C 变性 30 s,54 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2.0 min,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min,4 °C 保存。用浓度 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,切下目的带,用胶回收试剂盒回收。回收产物与 pMD19-T Vector 连接并转化大肠杆菌 DH₅α 菌株,经菌落 PCR、质粒酶切鉴定挑选出阳性克隆进行测序。测定结果用 Vector 软件与唐鱼 GH cDNA 全序列进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 唐鱼 GH cDNA 的克隆 唐鱼总 RNA 经反转录,用引物 GHSF 和 GHSR 进行 PCR 扩增,获得 1 条约 630 bp 的特异条带(见图 1 A)。用 R1 和 UMP 进行 5'RACE 扩增,以此扩

增产物为模板,以 R2 和 NUP 做半套式扩增后获得单一的特异条带,大小在 220 bp 处(见图 1 B)。引物 NP 和 M13 primer M4 进行 3'RACE 扩增,获得 1 条 530 bp 左右大小的条带(见图 1 C)。所获得的 PCR 产物分别经琼脂糖凝胶电泳回收后连接到 T 载体上,筛选阳性转化子进行测序。

将 5'和 3'端序列及核心序列用 Vector 软件拼接得到唐鱼生长激素基因的 cDNA 全长序列 1 145 bp(GenBank 登录号:EU367959)。经 ExPASy 软件在线分析,该基因的 5'非编码区为 64 bp,ORF 为 633 bp,3'非编码区为 448 bp。



注:A 为核心片段扩增结果,M 为 100 bp Ladder Marker;B 为 5'RACE 扩增结果,M 为 100 bp Marker;C 为 3'RACE 扩增结果,M 为 Marker III。

Note:A. Amplification result of the core fragment;M. 100 bp Ladder Marker;B. Amplification result of 5'RACE;M. 100 bp Marker;C. Amplification result of 3'RACE;M. Marker III.

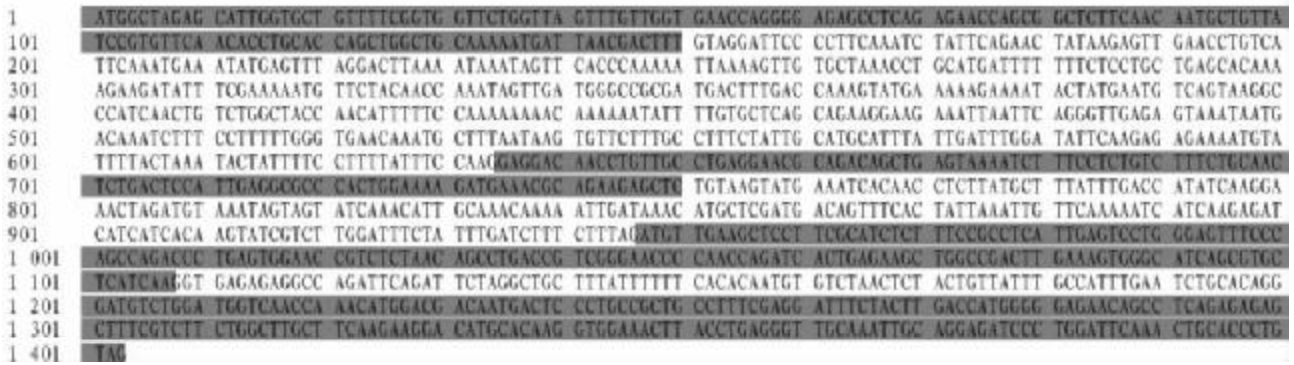
图 1 唐鱼 GH cDNA 扩增结果

Fig. 1 Amplification result of *Tanichthys albonubes* GH cDNA

2.2 唐鱼 GH gDNA 的克隆 以唐鱼基因组 DNA 为模板,以 GHSF 和 GHSR 为引物进行 PCR 扩增。PCR 产物测序结果显示,唐鱼生长激素基因的转录区长度为 1 403 bp,包括 4 个外显子和 3 个内含子,外显子大小分别 150、117、162、204 bp。3 个内含子都以 GT 开头,AG 结尾,符合 GT-AG 法则。唐鱼 GH gDNA 序列如图 2 所示。

2.3 唐鱼 GH 序列分析 根据 GenBank 上登录的 GH 序列,选取了分属 14 个科的 25 种鱼,与人及其他哺乳动物(牛、鼠、猪)、鸟类等分子进化树进行聚类分析。由表 2 可见,这 25 种分别来自鲤科,鲢科,丽鱼科,鳊科,棘臀鲈科,鳊科,胭脂科,鲮科,鳊科,鳊科,鳊科,香鱼科和鱼芒科。在所比较的这些 GH 成熟肽中,有 35 个氨基酸残基完全保守,这 35 个氨基酸残基在人、鼠、牛、猪及鸡的 GH 中也呈现较好的保守性。

唐鱼生长激素基因所编码的氨基酸与同一鲤形目的鱼类同源性较高,均超过 90%。与鲈形目的鲈、无齿和黄颡鱼的同源性均为 75%。与鲑形目的虹鳟、香鱼和大鳞大麻哈鱼的同源性分别为 66%、58% 和 65% 左右。与莫桑比克罗非鱼、尼罗罗非鱼、蓝太阳鱼、斜带石斑鱼、金枪鱼和金头鲷等鲈形目鱼类及鳊形目的日本鳊的同源性较低,在 52% 左右。而与高等脊椎动物如人、鸟类(鸡)和哺乳类动物(鼠、牛、猪)的同源性则在 40% 以下。鱼类生长激素的同源性与其的系统分类地位基本一致。表 2 所反映的各物种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



注:阴影部分为唐鱼生长激素基因的外显子。

Note:The shadow indicates exons of *Tanichthys albonubes* GH gene.

图2 唐鱼生长激素基因 gDNA

Fig.2 *Tanichthys albonubes* GH gDNA

一致。

3 结论与讨论

该研究首次克隆了唐鱼生长激素全长 cDNA 和转录区序列。唐鱼 GH 共编码 210 个氨基酸,其中包括 22 个氨基酸的信号肽和 188 个氨基酸的成熟肽。GH 成熟蛋白的分子量为 21.36 kD,等电点 pI 值为 5.67。在唐鱼 GH 的成熟肽中具有与已报道的其他鲤形目鱼类相同的 5 个半胱氨酸残基。前 4 个半胱氨酸残基的位置在不同目的鱼类中非常保守,在成熟肽中形成 2 个二硫键,对生长激素蛋白分子的正常折叠、维持空间结构以发挥有效的生理功能有着重要的作用^[6]。与其他鱼类及哺乳动物一样,唐鱼 GH 编码的氨基酸在第 82 位置上保留一个色氨酸残基。

近年来的转基因研究显示,转基因构件中的启动子和结构基因来自同缘物种,可能更有利于转植基因的有效表达^[7-9]。转自源基因不仅可有效提高基因的转录与表达水平,也可以减少转基因生物的食品安全方面的顾虑。转自源 GH 基因在受体鱼中能否发挥其预期的生物学效应一方面与转植基因的转录表达水平有关,另一方面可能还与表达的产物能否与受体鱼体内的特定受体有效结合有关,而这种结合的有效性和表达产物与受体鱼的同源性相关。近年来转自源基因鱼的研究已有成功报导^[10-11]。该研究克隆了唐鱼 GH cDNA 序列和 gDNA 序列,为下一步构建转自源 GH 基因

构件,进行唐鱼的转自源 GH 基因研究、培育出快长个大的唐鱼新品系奠定了基础。

参考文献

[1] 陈国柱,方展强,马广智. 唐鱼胚胎发育观察[J]. 中国水产科学,2004, 11(6):489-495.

[2] 陈湘淼,乐佩琦,林人端. 鲤科鱼类的科下类群及其宗系发生关系[J]. 动物分类学报,1984,9(4):424-440.

[3] 何瞬平,汪亚平,陈宜瑜. 五种鲤科鱼类的 RAPD 分析兼论稀有鳊鲫的系统位置[J]. 水生生物学报,1997,21(3):261-267.

[4] 梁建宏,连常平,刘汉生. 唐鱼全人工繁育试验[J]. 水利渔业,2003,23(6):30-31.

[5] 王树启,许友卿,丁兆坤. 生长激素对鱼类的影响及其在水产养殖中的应用[J]. 水产科学,2005,24(7):42-46

[6] 曹运长,李文笙,叶卫,等. 蓝太阳鱼生长激素全长 cDNA 的克隆与序列分析[J]. 水产学报,2004,28(5):589-593.

[6] DEVLIN R H, YESAKI T Y, BIAGI C A, et al. Extraordinary salmon growth [J]. Nature, 1994, 371:209-210.

[8] RAHMAN M A, MACLEAN N. Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene [J]. Aquaculture, 1999, 173:333-346.

[9] RAHMAN M A, MAK R, AYAD H, et al. Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Transgenic Res, 1998, 7:357-369.

[10] BEARDMORE J A. Transgenics: Autotransgenics and allotransgenics [J]. Transgenic Res, 1997, 6:107-108.

[11] LIU X, MOAV B, FARAS A J, et al. Functional analysis of elements affecting expression of the β -actin gene of carp [J]. Mol Cell Biol, 1990, 10:3432-3440.

(上接第 9820 页)

未优化前产酶量的 2.1 倍。通过添加碳酸钙表明,随碳酸钙浓度的增加,酶的活性有较大幅度的提高,该实验添加碳酸钙至 1.5 g/L 时,酶的活性最大,但再没有设定较高的浓度,在今后的实验中有待于进一步研究。

参考文献

[1] ANNISON G, CHOCT M. Anti-nutritive activities of cereal - non-starch polysaccharides in broiler diets and strategies for minimizing their effects [J]. Journal of Poultry Science, 1991, 47: 32-42.

[2] 高培基. 纤维素酶活力测定方法研究进展[J]. 工业微生物, 1985(6):5

-8.

[3] DAE-HYUK K, NAM S H, KYUNG M P. Over-production of *Phytolacca* insularis protein in batch and fed-batch of *Escherichia coli* [J]. Process Biochemistry, 2001, 36: 537-542.

[4] IRVIN J E, TEATHER R M. Cloning and expression of a Bactericides succinogenes mixed linkage β -glucanase gene in *Escherichia coli* [J]. Apply Environment Microbiology, 1998, 54: 2672-2676.

[5] JIONG H, HISANORI T, SHUNICHI A, et al. Cloning of a gene encoding a highly stable endo- β 1,4-glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001, 92(5): 434-441.