

文章编号: 1000-5471(2008)03-0057-06

## 南方鲇促生长激素释放激素基因的 部分 cDNA 克隆及序列分析<sup>①</sup>

魏 玲<sup>1</sup>, 程道军<sup>2</sup>, 王志坚<sup>1</sup>

1. 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715; 2. 西南大学 蚕学与系统生物学研究所, 重庆 400715

**摘要:** 促生长激素释放激素(GHRH)是一种重要的内分泌激素, 主要功能是调节脑垂体分泌生长激素(GH). 实验旨在克隆分析南方鲇 GHRH 基因的 cDNA 序列. 从南方鲇的脑组织中提取总 RNA 并反转录成 cDNA, 再根据已知 GHRH 基因的保守区域序列设计引物, 通过反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)实验, 获得了一条 334 bp 的片段并进行了测序. 序列信息分析表明, 该序列与沟鲇的 GHRH 基因同源, 相似性达 99%. 根据同源性检索结果推测该序列编码 110 个氨基酸, 并基于该编码序列分析了南方鲇 GHRH 的功能结构域以及南方鲇同其他物种的遗传发生关系.

**关键词:** 南方鲇; 促生长激素释放激素; cDNA 克隆; RT-PCR; 序列分析

**中图分类号:** S965.1

**文献标识码:** A

促生长激素释放激素(growth hormone-releasing hormone, GHRH)是动物下丘脑分泌的一种多肽类物质. GHRH 作为生长激素的正性调控因子, 能促进脑垂体合成和分泌生长激素. 目前, 已有多例关于编码 GHRH 基因克隆的报道. 江涌等<sup>[1]</sup>克隆了石斑鱼的 GHRH 基因的全长 cDNA, 并通过半定量 RT-PCR 方法对石斑鱼 GHRH 基因在胚胎发育和发育早期以及各部位的表达情况进行了分析; 汪以真等<sup>[2]</sup>基于 RT-PCR 实验克隆了猪 GHRH 基因的部分 cDNA 片段; 另外, 人、斑马鱼<sup>[3]</sup>、鸡<sup>[4]</sup>、青蛙<sup>[5]</sup>、泰国鲇<sup>[6]</sup>、沟鲇<sup>[7]</sup>等物种的 GHRH 基因也相继得到克隆.

南方鲇(*Silurus meridionalis*)是我国特有的大中型高档经济鱼类, 主要分布于长江、珠江及闽江流域. 该鱼具有个体大、生长快、抗病力强、肉多刺少、鲜嫩肥美等特点. 国内一些学者对其进行了较为系统和深入的研究, 但主要涉及传统生物学的内容. 近年来, 王德寿等<sup>[8-10]</sup>初步开展了该鱼的分子水平的研究工作, 宋平等<sup>[11]</sup>采用 RT-PCR 法以及 3'-RACE、5'-RACE 法从南方鲇脑垂体中克隆出南方鲇生长激素基因的 cDNA 序列, 但与生长激素分泌释放调节相关的 GHRH 基因的 cDNA 克隆研究还未见报道. 本研究采用 RT-PCR 方法, 以南方鲇脑组织总 RNA 为材料, 首次克隆了南方鲇 GHRH 基因的部分 cDNA 序列. 该研究为克隆南方鲇 GHRH 基因的全长 cDNA 序列及进一步分析其在南方鲇生长发育过程中的调节作用奠定了基础.

① 收稿日期: 2007-10-27

基金项目: 西南大学青年基金资助项目(124470-20700405).

作者简介: 魏 玲(1977-), 女, 重庆合川人, 讲师, 硕士, 主要从事分子细胞生物学研究.

通讯作者: 王志坚, 副教授, 硕士研究生导师.

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

野生南方鲇购于嘉陵江合川段,将南方鲇活体带回实验室,解剖分离出脑组织并用 DEPC 水处理后,再迅速冷冻于液氮中,用于提取总 RNA.

### 1.2 主要试剂

Trizol, M-MLV 反转录酶(莫洛尼鼠类白血病病毒反转录酶), RNA 酶抑制剂, Taq DNA 聚合酶, dNTP, 琼脂糖, Tris.

### 1.3 引 物

根据已知 GHRH 基因的保守区域设计合成了 4 对扩增南方鲇 GHRH 基因的引物,并设计了一对扩增对照基因即肌动蛋白基因的引物(表 1).

表 1 用于扩增南方鲇 GHRH 基因的引物

引 物	上游引物	下游引物
$\beta$ -actin	5' TCTCCATCCACGTCGGCCAG 3'	5' TAAGTGCCCGTGCGAACCTC3'
primer 1	5' ACCTCTACCTGTTCCACCTCG 3'	5' TGTCTGGCTTGTCTTGTGC 3'
primer 2	5' GCCACCATCATCAACAACAAA 3'	5' TCGATCTCGACGATGTCCTT 3'
primer 3	5' CGTGGCGTGATTGACTTT 3'	5' GAATGCGTGGATGACAGAG 3'
primer 4	5' TTTGTTCCAGGCGAGTC 3'	5' GTTGGCTTCTTGTCTTCTTA 3'

### 1.4 南方鲇脑组织总 RNA 的抽提

将适量 Trizol 抽提缓冲液加入 15 mL 离心管中并在冰上预冷,然后取 1.5 g 组织在研钵中用液氮研磨成粉末状,并迅速转移至预冷的 Trizol 抽提缓冲液中,再根据 Trizol 试剂操作步骤提取脑组织 RNA. 最后对 RNA 质量进行凝胶电泳检测.

### 1.5 RT-PCR 扩增

#### 1.5.1 反转录合成 cDNA

反转录反应体系为 25  $\mu$ L: 包括 DEPC 处理水 11.0  $\mu$ L, 脑组织总 RNA 4.0  $\mu$ L(20.0 ng~2.0  $\mu$ g), Oligo(dT) 1.0  $\mu$ L, 5 $\times$ 反转录酶 buffer 5.0  $\mu$ L, 2.5 mM dNTPs 2.0  $\mu$ L, 25 U/ $\mu$ L RNase inhibitor 1.0  $\mu$ L, 200 U/ $\mu$ L M-MLV 反转录酶 1.0  $\mu$ L. 反应条件: 先将 DEPC 处理水 10.0  $\mu$ L、RNA 和 Oligo(dT)加入 0.2 mL 的离心管, 70  $^{\circ}$ C 温浴 10 min 后, 迅速冰浴, 然后依次加入 5 $\times$ 反转录酶 buffer、dNTPs、RNase inhibitor 和反转录酶, 加 DEPC 处理的水至终体积 25.0  $\mu$ L, 42  $^{\circ}$ C 温浴 60 min. 最后加 DEPC 处理水稀释 3 倍, -20  $^{\circ}$ C 保存.

#### 1.5.2 目标基因的 RT-PCR 扩增

PCR 反应体系为 25  $\mu$ L: 10 $\times$ reaction buffer 2.5  $\mu$ L, 2.5 mM dNTPs 2.0  $\mu$ L, 2.5 mM Mg<sup>2+</sup> 1.5  $\mu$ L, 10 mmol/L 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, 10 ng/ $\mu$ L cDNA 1.0  $\mu$ L 为模板, 5 U/ $\mu$ L Tag DNA 聚合酶 0.2  $\mu$ L, 加双蒸水至 25.0  $\mu$ L. 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后在 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s、T<sub>m</sub> 温度退火 30 s、72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s 条件下运行 35 个循环, 72  $^{\circ}$ C 复性 10 min, 4  $^{\circ}$ C 保存.

### 1.6 序列测定与生物信息学分析

PCR 产物纯化后直接送到上海英俊生物技术公司测序. 利用在线 BLAST 进行序列的同源性检索分析, 并通过检索结果推导序列编码的蛋白质序列, 蛋白质序列的功能结构域分析采用在线 SMART 程序 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). 运用 ClustalX 程序进行蛋白质序列多重比对和聚类分析.

## 2 结果与分析

### 2.1 南方鲇脑组织的总 RNA

GHRH 基因的表达具有组织特异性, GHRH 基因在动物脑组织的表达水平较高, 故在实验中采用南方鲇脑组织作为供试材料提取总 RNA, 并重复一次. 试验中采用 trizol 法提取南方鲇脑组织总 RNA, 从总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图能清楚地观察到 28S、18S 和 5.8S(5S) 共 3 条清晰的 rRNA 条带, 表明 RNA 无降解, 无 DNA 污染, 能满足试验要求(图 1).

### 2.2 反转录结果检测

以反转录合成的 cDNA 为模板, 用  $\beta$ -肌动蛋白基因的特异引物进行 PCR 扩增, 电泳检测其条带大小约为 400 bp 左右, 与设计的扩增片段大小(405 bp)一致(图 2). 这表明所合成的 cDNA 模板可以用于后续的实验研究.

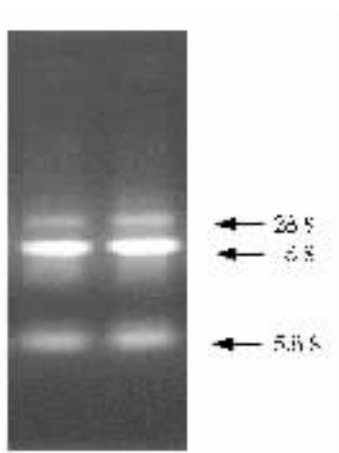
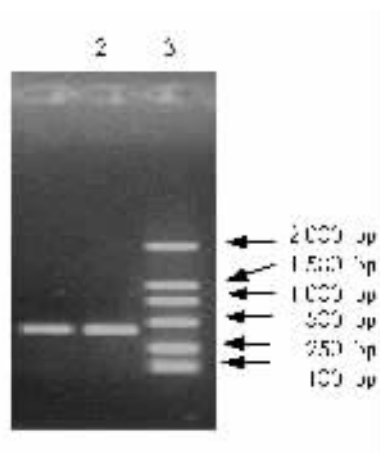


图 1 南方鲇脑组织总 RNA 的琼脂糖电泳图



1. 总 RNA1 中  $\beta$ -actin 的扩增产物;  
2. 总 RNA2 中  $\beta$ -actin 的扩增产物; 3. 分子量标记

图 2  $\beta$ -actin 检测图

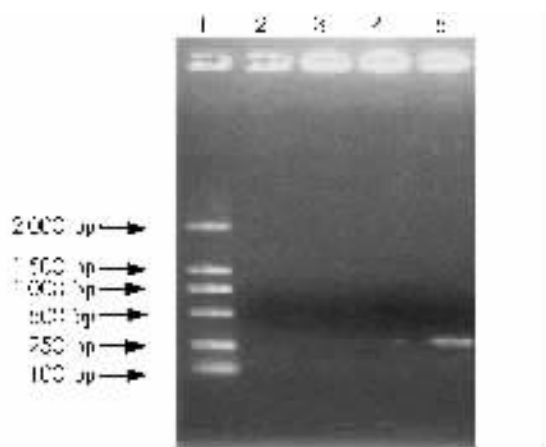
### 2.3 目标基因的 RT-PCR 扩增

再以反转录得到的 cDNA 产物之一为模板, 用设计合成的四对特异 GHRH 引物进行 RT-PCR 扩增. 其中三对引物没有扩增出条带, 第四对引物扩增出一条特异性的条带, 片段大小在 330 bp 左右(图 3). 为证实该扩增产物是否就是编码南方鲇 GHRH 基因, 我们重新用第四对引物进行了大量扩增, 在取少量电泳检测并确认与第一次扩增的结果一致后, 对剩余的 PCR 产物直接进行了纯化测序.

### 2.4 cDNA 片段测序及同源性检索

通过 PCR 产物直接测序表明目标 cDNA 片段全长 334 bp, 序列如下:

TTTTGGCTCTGCTCATCTACGGGATCTTAATGCGCTACAGCGCCAATGCACACCCATCGGA  
ATGGGCTTCCCAACATGAGGCTAGAAAACGACGTGTTTGGGGATGAGGGAACTCGTTAAGT  
GAGCTCTCCTACGAGCCGGACACTATGAGCGCGCGCAGTGCTCCAGCCCTCCCGGAGGACGCGTA



1. 分子量标记; 2. 引物 1 扩增产物; 3. 引物 2 扩增产物;  
4. 引物 3 扩增产物; 5. 引物 4 扩增产物

图 3 RT-PCR 产物琼脂糖电泳图

CACACTGTATTACCCGACCGAGAGAAGAGCCGAAACGCATGCAGACGGATTGTTAGATAGAGC  
CTTGAGGGACATCCTGGTTCAGTTATCAGCCCGAAAATATCTGCATTCTCTGACGGCAGTTCGC  
GTAGGTGAGGAAGAAGA

利用 NCBI 中的 BlastX 程序(核苷酸序列检索蛋白质序列数据库)分析发现,该片段与动物的 GHRH 基因有同源性,但与沟鲈和泰国鲈的相似性最高,相似值分别达到了 99%和 96%,这表明该片段是本研究所设计的目的基因,即南方鲈 GHRH 基因,但检索也发现该序列只是南方鲈 GHRH 基因的部分序列,并不是其全长 cDNA(表 2)。

表 2 目的片段同源性检索统计

物 种	NCBI 登录号	E value	相似性/%
沟 鲈	AAK66970	3.00E-61	99
泰国鲈	P48144	2.00E-58	96
斑马鱼	NP_999880	4.00E-44	72
鳕 鱼	AAZ85701	1.00E-38	59
石斑鱼	AAV43851	1.00E-37	58
河 豚	CAG12289.1	2.00E-36	58
虹鳟鱼	AAK28557	2.00E-36	57
大马哈鱼	CAA51705	7.00E-35	56
鸡	AAX56089	7.00E-27	47
鸭	ABE01122	1.00E-25	45
翻车鱼	AAV85450	2.00E-25	42
负 鼠	XP_001368243	9.00E-24	45
爪 蛙	AAD56956	8.00E-23	42
湿地蛙	Q09169	5.00E-22	40
挪威鼠	NP_058685	1.00E-21	44

## 2.5 南方鲈 GHRH 基因的生物信息分析

### 2.5.1 编码氨基酸序列推导

根据同源性检索结果可以推导出目的 cDNA 片段共编码 110 个氨基酸,具体氨基酸序列是:

LALLIYGILMRYSAQCTPIGMGFPMRLENDVFGDEGNLSLSELSYEPDTMSARSAPALPEDAYT  
LYYPTERRAETHADGLLDRLRDILVQLSARKYLHSLTAVRVGEEE

### 2.5.2 功能结构域分析

利用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)程序对推导的氨基酸序列进行功能结构域分析,结果发现该序列的 76~102 位具有 GHRH 典型的 GLUCA 结构域(图 4)。GLUCA 具有胰高血糖素类似激素活性,而胰高血糖素类似激素属于一组结构上相关的肽,包括促生长激素释放激素和分泌素等。该类激素能通过抑制肝糖原合成、刺激肝糖原分解和加速糖异生途径来调节肝脏中的糖代谢。

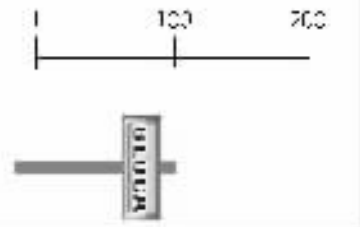


图 4 南方鲈 GHRH 基因的功能结构域

### 2.5.3 遗传发生关系分析

我们下载了与南方鲈 GHRH 有同源性的其他 15 个物种的 GHRH 蛋白序列,基于这些序列分析了南方鲈与这些物种的系统发生关系,建立了系统进化树(图 5)。从图中可以清楚看到:该遗传树大致分为 2 个分支,分支 I 主要为非鱼类动物,包括鼠、鸡、鸭、蛙等。分支 II 为鱼类动物。在分支 II 中,又可以分为两个小类别,一类包括虹鳟鱼和大马哈鱼;另一类包括鲈鱼、斑马鱼、河豚、鳕鱼、翻车鱼等,其中南方鲈与沟鲈和泰国鲈的亲缘关系最近。有趣的是重要模式动物斑马鱼与鲈鱼的遗传关系相对较近。总之,基于 GHRH 所建立的系统关系树与所代表的动物的进化基本一致。

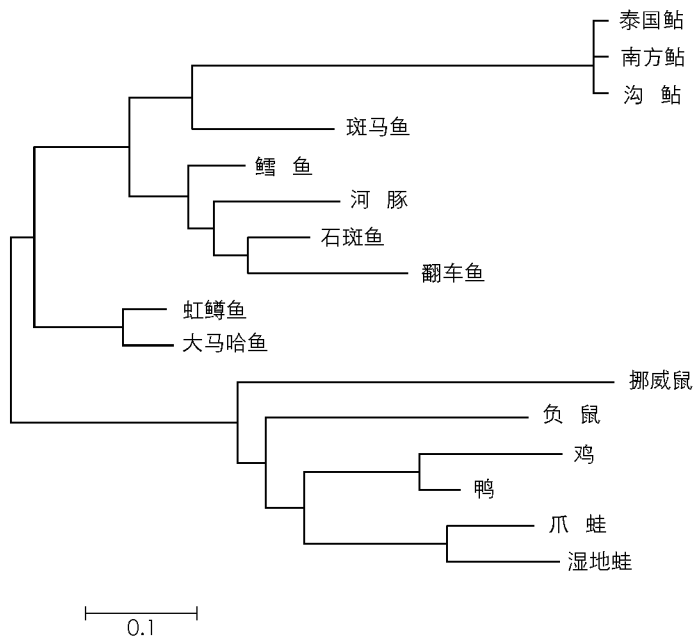


图5 南方鲷同其它物种的系统进化树

### 3 讨 论

本研究利用 RT-PCR 实验, 获得了南方鲷 GHRH 基因的部分 cDNA 序列. 基于该序列的同源性检索和遗传聚类分析发现, 该基因与同属鲷形目的沟鲷和泰国鲷的相似性最高, 提示这 3 个物种的亲缘关系最近, 与其他鱼类遗传关系相对较远. 而非鱼类动物在聚类上先聚为一支, 再与包括南方鲷在内的所有鱼类动物所聚的另外一支相聚. 因此, 基于 GHRH 所建立的遗传发生树与所代表动物的进化基本一致. 南方鲷 GHRH 基因的部分 cDNA 序列的获得, 为我们进一步对该基因进行全长 cDNA 克隆奠定了基础. 所以, 后续研究重点在于通过其他的技术手段, 如 3'-RACE 和 5'-RACE 技术来获得南方鲷 GHRH 基因的全长 cDNA 序列, 并进一步研究其功能.

#### 参考文献:

- [1] Jiang Y, Li W S, Xie J, et al. Sequence and Expression of a cDNA Encoding both Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide and Growth Hormone-releasing Hormone in Grouper(*Epinephelus coioides*) [J]. ACTA BIOCHIMICA et BIOPHYSICA SINICA, 2003, 35(9): 864 - 872.
- [2] 汪以真, 颜新春, 余东游. 猪下丘脑促生长激素释放激素(GHRH)基因克隆及序列分析 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, 26(3): 277 - 279.
- [3] Fadinger E A, Sherwood N M. Characterization of the Gene Encoding both Growth Hormone-releasing Hormone and Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide in the Zebrafish [J]. Mol Cell Endocrinol, 2000, 165: 211 - 219.
- [4] McRory J E, Parker R L, Sherwood N M. Expression and Alternative Processing of a Chicken Gene Encoding both Growth Hormone-releasing Hormone and Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide [J]. DNA Cell Biol, 1997, 16(1): 95 - 102.
- [5] Alexandre D, Vaudry H, Jegou S. Structure and Distribution of the mRNAs Encoding Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide and Growth Hormone-releasing Hormone-like Peptide in the Frog, *Rana ridibunda* [J]. J comp Neurol, 2000, 421(2): 234 - 246.
- [6] McRory J E, Parker D B, Ngamvongchon S. Sequence and Expression of cDNA for Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) and Growth Hormone-releasing Hormone (GHRH)-like Peptide in Catfish [J]. Mol Cell En-

doocrinol, 1995, 108: 169 – 177.

- [7] Small B C, Nonneman D. Sequence and Expression of a cDNA Encoding both Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide and Growth Hormone-releasing Hormone-like Peptide in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Gen Commo Endocrinol, 2001, 122(3): 354 – 363.
- [8] Jiao B W, Huang X G, Chan C B, et al. The co-existence of Two Growth Hormone Receptors in Teleost Fish and Their Differential Signal Transduction, Tissue Distribution and Hormonal Regulation of Expression in Seabream [J]. J Mol Endocrinol, 2006, 36(1): 23 – 40.
- [9] 黄希贵. 南方鲇生长激素受体 cDNA 的克隆以及鱼类存在两种生长激素受体的证明 [D]. 重庆: 西南师范大学硕士论文, 2004.
- [10] 张修月. 人工繁殖南方鲇性别决定与分化相关因子的初步研究 [D]. 重庆: 西南师范大学硕士论文, 2005.
- [11] 宋平, 胡隐昌, 向筑, 等. 南方鲇生长激素完整 cDNA 的克隆及其 DNA 序列分析 [J]. 水生生物学报, 2002, 26(3): 272 – 279.

## Cloning and Sequence Analysis of a Fragment cDNA Encoding Growth Hormone-releasing Hormone in Southern Catfish

WEI Ling<sup>1</sup>, CHENG Dao-jun<sup>2</sup>, WANG Zhi-jian<sup>1</sup>

1. School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Institute of Sericulture and Systems Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** Growth hormone-releasing hormone (GHRH) is an important endocrinal hormone and involves in regulating the secretion of growth hormone in pituitary. This study will focus on cloning gene encoding GHRH of southern catfish. Total RNA was extracted from the brain of southern catfish. RT-PCR primer pairs for GHRH were designed based on the conserved domain of the known GHRH genes. A cDNA fragment with the length of 334 bp was obtained by RT-PCR. Bioinformatics analysis showed that the cDNA sequence have high identity (99%) with the cDNA encoding GHRH of channel catfish. According to homologous search, the authors predicted that this sequence encoded 110 amino acids. The functional domain and phylogenetic tree between southern catfish and other species were also surveyed based on the amino acid sequence.

**Key words:** *Silurus meridionalis*; growth hormone-releasing hormone; cDNA cloning; RT-PCR; sequence analysis

责任编辑 夏娟